

**Nachweis von Sojaprotein
in hocherhitzten Fleischerzeugnissen
mit Hilfe der standardisierten
indirekten Hämagglutinationsreaktion**

Gisa Christine Wagenstaller

1972

Aus dem Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der
Lebensmittel tierischen Ursprungs der
Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Professor Dr. Dr. h. c. L. Kotter

Nachweis von Sojaprotein
in hocherhitzten Fleischerzeugnissen mit Hilfe der
standardisierten indirekten Hämagglutinationsreaktion

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der veterinär - medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig - Maximilians - Universität
München

von

Gisa Wagenstaller

aus

München

München 1972

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Herr Prof. Dr. J. Boessneck
Referent: Herr Prof. Dr. Dr.h.c. L. Kotter
Korreferent: Herr Priv.- Doz. Dr. W. Kreuzer

Tag der Promotion: 11. Februar 1972



UNI-DRUCK, 8 München 13, Amalienstr. 85

IN DANKBARKEIT MEINEM MANN

A. Einleitung	1
B. Literatur	2
I Chemische Methoden zum Nachweis von Sojaprotein in Fleischerzeugnissen	2
II Serologische Methoden zum Nachweis von Sojaprotein	2
1. Präzipitation	3
a) Allgemeines	3
b) Röhrchenpräzipitation zum Nachweis von Fremdeiweiß	3
α) Ringpräzipitation	3
β) Präzipitattmessung	5
c) Präzipitation in Agar-Gel	6
α) Allgemeines	6
β) Agar-Gel-Diffusion zum Nachweis von Fremdeiweiß	6
d) Immunelektrophorese	8
α) Allgemeines	8
β) Der Nachweis von Fremdeiweiß mittels der Immunelektrophorese	8
e) Fluoreszenzmarkierung der Antikörper für den Nachweis von Fremdeiweiß	9
2. Hämagglutination	10
a) Allgemeines zur Methode	10
b) Spezielles zur Methode	11
c) Die indirekte Hämagglutination als Nachweisreaktion von Fremd- eiweiß in erhitzten Fleisch- erzeugnissen	13
3. Methoden zur Standardisierung der sensibilisierten Erythrozyten	14
4. Angewandte Immunisierungsmethoden	16
a) Immunisierung mit erhitztem Antigen zur Gewinnung von Antiseren gegen Fremdeiweiße	18
α) Allgemeines	18
β) Antigenaufbereitungsverfahren	19
5. Extraktionsverfahren	21

	Seite
C. Eigene Untersuchungen	23
I Prüfung verschiedener Konservierungsmittel auf ihre Eignung als Zusatz zu sensibilisierten Hammelerythrozyten	23
1. Prüfung verschiedener Konservierungsmittel in steriler Alserverseher Lösung aufge- schwemmten sensibilisierten Hammelerythro- zyten	38
2. Aufbewahrung der sensibilisierten Hammel- erythrozyten in handelsüblichen Blut- konserven	38
II Verwendung formalinisierten Hammelerythrozyten zur Sensibilisierung mit Sojaprotein	41
1. Formalinisierung der Hammelerythrozyten	41
2. Antigenherstellung und Antiserumgewinnung	42
3. Ermittlung geeigneter Sojaproteinkonzen- trationen für die Sensibilisierung formalin- isierter Hammelerythrozyten	42
III Durchführung der indirekten Hämagglutination mit formalinisierten, sensibilisierten Hammel- erythrozyten zur quantitativen Bestimmung von Sojaprotein	43
1. Extraktgewinnung	46
2. Bestimmung des Gesamteiweißgehaltes der Modellchargen nach Kjeldahl sowie des Gesamteiweißgehaltes der Extraktionslösun- gen mittels der Biuretreaktion	47
3. Voradsorption des Antigens mit dem Antiserum	47
4. Untersuchung von nicht erhitztem Material	52
5. Untersuchung von bis auf 70° C erhitztem Material	55
6. Untersuchung von bis auf 115° C erhitztem Material	58
IV Mikrotitermethode zum quantitativen Nachweis von Sojaprotein in Fleischerzeugnissen	62
1. Untersuchung von nicht erhitztem Material	63
2. Untersuchung von bis auf 70° C erhitztem Material	65
3. Untersuchung von bis auf 115° C erhitztem Material	67

V	Versuche zur Reproduzier- barkeit der Untersuchungs- ergebnisse	70
D.	Diskussion	71
E.	Zusammenfassung	78
F.	Literaturverzeichnis	80

Lebenslauf

A. Einleitung

Am 25.8.1969 ist für den Bereich der Bundesrepublik ein Gesetz in Neufassung verabschiedet worden, das die Verarbeitung von Fremdeiweißen tierischer Herkunft (aufgeschlossenes Milcheiweiß (aMe), Hühnereiklar (HE), Trockenblutplasma (TBP)) bei bestimmten Fleischerzeugnissen nur unter entsprechender Kenntlichmachung und Mengenbegrenzung zuläßt (70). Die Verarbeitung anderer Fremdeiweiße z. B. Weizengluten, Fischeiweiß und Sojaprotein in Fleischerzeugnissen ist generell unzulässig.

Da die Verarbeitung von Sojaprotein durch einzelne gewerbliche Betriebe in den letzten Jahren immer mehr Überhand genommen hat und mit den bisher bekannten chemischen Verfahren der Nachweis von Sojaprotein in Fleischerzeugnissen nicht befriedigend geführt werden kann, hat es nicht an Untersuchungen gefehlt, verschiedene serologische Methoden für den Nachweis vorzuschlagen.

Mit Hilfe der indirekten Hämagglutination weist HERRMANN (36) Sojaprotein in Konzentrationen ab 0,2 % bei bis auf 115° C erhitzten Fleischerzeugnissen quantitativ nach. Um diese Reaktion so zu modifizieren, daß sie breite Anwendung auch im Routinebetrieb finden kann, sollte geprüft werden, inwieweit sich die indirekte Hämagglutinationsreaktion durch Standardisierung und Konservierung der sensibilisierten Hammelerythrozyten vereinfachen läßt. Die Eignung dieser modifizierten Reaktion zum quantitativen Nachweis sollte mit Sojaprotein geprüft werden.

B. Literatur

I. Chemische Methoden zum Nachweis von Sojaprotein in Fleischerzeugnissen:

Zum Nachweis von Sojabohnenmehl in Fleischerzeugnissen hat HENDREY (30) eine Methode ausgearbeitet, die mit Hilfe der Ermittlung der nicht vergärbaren Zucker des Sojabohnenmehls durchgeführt wird. MIERMEISTER (46) entwickelte eine Methode bei der das Sojabohnenmehl annähernd quantitativ durch Bestimmung des Rohfasergehaltes geführt werden konnte. BAILEY (1) hat den Nachweis von Sojabohnenmehl über Glycinin geführt. Der Nachweis von isoliertem, rohfaserfreiem Sojaseiweiß macht aber noch Schwierigkeiten. Es besteht jedoch die Möglichkeit, durch Zugabe eines nicht toxischen und inerten Minerals wie Titaniumdioxid, das für Lebensmittel geeignet ist, in einer Menge von ca. 0,1 % zum isolierten Sojaseiweiß, wovon bei Zugabe von 2,0 % Sojaprotein nur noch 20 ppm in der Wurst vorhanden sind, isoliertes Sojaprotein qualitativ und quantitativ nachzuweisen.

II. Serologische Nachweismethoden von Sojaseiweiß

Die bisher bekannten serologischen Verfahren basieren auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei 3 Reaktionsformen unterschieden werden: Agglutination, Präzipitation und Lysis.

Nach STAUFF (62) ist die Antigen-Antikörper-Reaktion eine spezifische Reaktion zwischen zwei kolloidalen Substanzen, die miteinander unter Bildung von "Aggregaten", die makroskopisch als unlösliche Substanzen ausfallen, reagieren.

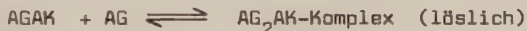
1. P R Ä Z I P I T A T I O N

a) Allgemeines

Nach SCHMIDT (57) ist die Präzipitation die "einfachste in vitro vor sich gehende Reaktion zwischen Antigen und Antikörper." Mit dieser Reaktion können Antigen und Antikörper quantitativ und qualitativ in flüssiger Phase, im Gel und in Gewebsschnitten bestimmt werden. Antigen und Antikörper reagieren in den meisten Fällen miteinander, da die Antigene multivalent und die Antikörper mindestens bivalent sind. Die AG-AK-Reaktionen sind reversibel:



Im Falle eines Antigenüberschusses kommt es jedoch zur Bildung löslicher AGAK-Komplexe:



b) Röhrchenpräzipitation zum Nachweis von Fremdeiweiß

ℳ) Ringpräzipitation

UHLENHUTH (63/64) führte als erster die Röhrchen-, auch Ringpräzipitation genannt, in die Lebensmitteluntersuchung ein. Nachdem es ihm gelungen war, verschiedene Proteine zu differenzieren, wurde diese "biologische Untersuchung" auch für die Auslandsfleischschau bindend vorgeschrieben (11). UHLENHUTH führte ursprünglich die Röhrchenpräzipitation in Reagenzgläsern durch. An der auftretenden Trübung und Ausflockung in der Mischung von klaren Antigen- und Antiserumverdünnungen las man die Reaktionsgeschwindigkeit und Intensität ab. Da diese Reaktion von mancherlei Zufälligkeiten abhängig war, konnte UHLENHUTH die Empfindlichkeit dieser Reaktion durch die Einführung der "Ringpräzipitation", bei

der die beiden Komponenten über- oder unterschichtet werden, erreichen. An der Berührungsstelle von Antigen- und Antikörperlösung kommt es zur Bildung einer ringförmigen Trübungszone.

Bei der Präzipitation unterscheidet man zwischen dem α - und β -Verfahren. Beim α -Verfahren wirken konstante Konzentrationen des Antikörpers auf variable Antigenkonzentrationen ein (11). Beim β -Verfahren (53) reagieren variable Antikörperkonzentrationen mit einer konstanten Antigenkonzentration. Trotzdem beim α -Verfahren methodisch mehr Serum benötigt wird als beim β -Verfahren wurde in Veröffentlichungen der Nachweis von Fremdeiweiß nur mit dem α -Verfahren beschrieben.

SINELL (59) sowie HELLMANN und QUENTIN führten ebenfalls den quantitativen Nachweis von Hühnereiklar in Brühwürsten mittels der Ringpräzipitation nach dem α -Verfahren (29).

13) Präzipitattmessung

Nachdem HEIDELBERGER und seine Schule (27/28) exakte Methoden zur quantitativen Messung von Antigenen und Antikörper eingeführt hatten, konnte der biochemische Ablauf der Präzipitation geklärt werden.

Die Genauigkeit einer quantitativen Präzipitattmessung ist abhängig von der Sorgfältigkeit, mit der sie durchgeführt wird. Dabei spielt die Menge der gemessenen Antigene oder Antikörper eine entscheidende Rolle.

Bei der quantitativen Präzipitattmessung betrachtet man den Verlauf der Präzipitationsreaktion als Funktion der Zugabe steigender Mengen Antigen zu einem konstanten Antiserumvolumen. Die Genauigkeit dieser Methode beträgt bei sorgfältiger Durchführung $\pm 2-5\%$ und hängt von der Menge der gemessenen Antigene oder Antikörper ab.

DEGENKOLB und HINGERLE (12/13) benutzten die quantitative Präzipitattmessung für den Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß und von Sojaprotein in auf 115°C erhitzten Fleischerzeugnissen und von Trockenblutplasma in Roh- und Brühwürsten. Sie sicherten einen Überschuß an Antikörpern, um das Antigen im Präzipitat zu konzentrieren. Da erst die Untersuchungen des Überstandes die Erstellung genauer Präzipitationskurven erlaubt, haben die Verfasser zur Bestimmung der Höhe des Fremdeiweißzusatzes neben gravimetrischen Präzipitationsmessungen mit dem Überstand noch die indirekte Hämagglutination durchgeführt. Durch den Vergleich der Ergebnisse der Präzipitationsmenge und der Hemmtiter in der indirekten Hämagglutination konnten die Verfasser Zusätze an Fremdeiweiß unter 1% mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1\%$, zwischen $1,0-2,0\%$ mit $\pm 0,15\%$ und über $2,0\%$ mit $\pm 0,2\%$ ermitteln.

c) Präzipitation in Agar-Gel

α) Allgemeines

Die Präzipitation in Gelen wurde von OUDIN (50) und DUCHTERLONY (48/49) in Form der Agar-Gel Diffusion eingeführt und hat inzwischen auf allen Gebieten der Immunologie Eingang gefunden.

Man unterscheidet zwischen der Einfach- und Doppeldiffusion. Bei der Einfachdiffusion diffundiert entweder nur das Antigen oder nur der Antikörper, während bei der Doppeldiffusion Antigen und Antikörper in einer in eine Petrischale oder auf eine Glasplatte (Objektträger) gegossenen Agarschicht aufeinander zu diffundieren. In den Agar wird eine Anzahl von Löchern gestanzt. Von den vielen Anordnungen wird am häufigsten die aus einem zentralen Loch mit sechs regelmäßig darum angeordneten Außenlöchern verwendet. Bei der Doppeldiffusion wird i.d.R. das zentrale Loch mit Antiserum gefüllt, die Außenlöcher mit verschiedenen Antigenen oder einer Antigenverdünnungsreihe. Von jedem Loch findet eine konzentrische Diffusion statt. Beim Zusammentreffen von Antigen mit einem homologen Antikörper bilden sich sog. "Präzipitationsbanden". Da bei dieser Reaktion getrübbte Antiseren und Antigenlösungen Anwendung finden können, hat sie auch Anwendung bei Nachweisen von Fremdeiweißen in Fleischerzeugnissen gefunden.

β) Agar-Gel- Diffusion zum Nachweis von Fremdeiweiß

HERRMANN und Mitarbeiter (36) konnten mit dieser Methode zwischen den Milcheiweißkonzentrationen von 1,5;2,0; 2,5 und 3,0 % in bis auf 75° C erhitzten Fleischerzeugnissen quantitativ differenzieren. Wurde das Untersuchungsmaterial auf 90-93° C erhitzt, so konnten erst Konzentrationen ab 3,0 % erfaßt werden.

Auch WYLER und SIEGRIST (69) wiesen mittels der Agar-Gel-Diffusion aufgeschlossenes Milcheiweiß und Sojaprotein in Wurstwaren nach. Sie konnten Milcheiweiß in Konzentrationen ab 0,1% und Sojaprotein ab 0,3% nachweisen. Über den Grad der Erhitzung wurden jedoch keine Angaben gemacht.

ENOCH (14) benutzte die Methode zum Nachweis von Trockenblutplasma. Sie konnte in Brühwürsten (15 min Kerntemperatur von 70° C) durch Einfügen von Zwischenverdünnungen Trockenblutplasma grob quantitativ erfassen. Bei höher erhitztem Material waren Versuche zur quantitativen Differenzierung von Trockenblutplasma erfolglos.

HERRMANN und Mitarbeiter (36) prüften in weiteren Versuchen die Spezifität der Agar-Gel-Diffusion für den Nachweis von Trockenblutplasma in Roh- und Brühwürsten. Aufgrund ihrer Untersuchungen haben sie erwogen, wenigstens bei der Beurteilung von Rohwurst zugunsten des Herstellers erst dann einen Blutplasmazusatz zu unterstellen, wenn die Extraktverdünnungen ab 1:50 eindeutig positive Reaktion ergibt, bei Brühwurstmaterial ab einer eindeutig positiven Reaktion der Extraktverdünnungen von 1:10.

GÜNTHER (19) führte den quantitativen und qualitativen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß und Sojaprotein mit Hilfe der Einfachdiffusion nach HAYWARD und AUGUSTIN (26) und der Doppeldiffusion nach DUCHTERLONY (48/49). Die Durchführung der Geldiffusion auf Cellulose-Acetatfolien wurde auch zum qualitativen Nachweis von Fremdeiweiß benutzt (20).

d) Immunelektrophorese

2) Allgemeines

Durch Kopplung der elektrophoretischen Analyse mit der Diffusion entwickelten GRABAR und WILLIAMS (18) ein äußerst leistungsfähiges Verfahren, das heute in der Immunologie weiteste Verbreitung gefunden hat. Die Bewegung eines Proteins im elektrischen Feld im Agar-Gel wird einmal durch sein elektrisches Potential und zum anderen durch Elektroendosmose bestimmt. Beide miteinander konkurrierenden Kräfte bewirken die Wanderung der Proteine entweder anoden- oder kathodenwärts.

Das sehr einfache Prinzip dieser Methode besteht darin, daß die zu prüfende Antigenmischung auf einen mit Agar beschichteten Objektträger in einem kleinen zentralen Loch aufgetragen und an das Stromsystem angeschlossen wird. Die Proteine wandern, aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität, verschieden schnell, so daß sie sich nach Abschluß der Elektrophorese an verschiedenen Stellen im Agar befinden. In eine senkrecht zur Wanderungsachse der Proteine ausgestanzte Rinne wird Antiserum eingefüllt, so daß bei der nun stattfindenden Doppeldiffusion jedes Protein mit seinem Antikörper unter Bildung von Präzipitationsbögen reagieren kann.

β) Der Nachweis von Fremdeiweiß

Erstmals verwendete HANSON (21) die Immunelektrophorese zum qualitativen Nachweis von Fremdeiweiß. Mittels der sogenannten "Komparativimmunelektrophorese" konnten HANSON (21) sowie WADSWORTH und HANSON (65) einen Trockenmilchzusatz bis zu 0,1 % zum Untersuchungsmaterial noch sichtbar machen.

ENOCH (14) konnte TBP mittels der IE nur in bis auf 70-75° C erhitztem Material ab Konzentrationen von 1,8 % qualitativ nachweisen. Sowohl eine quantitative sowie semiquantitative Aussage war aufgrund des wenig differenzierten Präzipitationsbildes nicht möglich.

KLUGE-WILM (39) sowie SINELL und KLUGE-WILM (61) prüften die Immunelektrophorese in der Mikromodifikation nach SCHEIDEGGER (55) auf ihre Eignung zum quantitativen Nachweis von Milcheiweiß. Die Milcheiweißzusätze ließen sich in Brühwürsten leicht nachweisen. Bereits ein Zusatz von 0,25% war zweifelsfrei nachzuweisen.

Auch in autoklaviertem Material (115 und 120⁰ C) war der Nachweis positiv zu führen.

HERRMANN und KOTTER (36) halten jedoch bestenfalls eine "semi-quantitative" Aussage mittels der Immunelektrophorese für möglich.

GÜNTHER (19) wies mit der Objektträgermethode nach SCHEIDEGGER aufgeschlossenes Milcheiweiß, Sojaprotein und Hühnereiweiß qualitativ nach. Sojaprotein reagierte in bis auf 85⁰ C erhitztem Material ab 0,05% positiv.

KRÜGER (43) sowie KRÜGER und GROßKLAUS (44) konnten in niedrig erhitztem Material (75⁰C) quantitativ Sojaprotein erfassen, während bei höher erhitztem Material der Nachweis nur qualitativ geführt werden konnte.

e) Fluoreszenzmarkierung der Antikörper für den Nachweis von Fremdeiweiß

Die Bindung von Antigen mit dem korrespondierendem Antikörper kann mit den klassischen serologischen Reaktionen nur indirekt nachgewiesen werden. Durch die von COONS und KAPLAN (7) entwickelte Methode der Markierung von Antikörpern mit fluoreszierenden Farbstoffen lassen sich nunmehr Antigen- Antikörper-Komplexe unmittelbar optisch nachweisen.

HERRMANN und Mitarbeiter (35) haben mit dieser Methode aufgeschlossenes Milcheiweiß in bis auf 120⁰C erhitzten Fleisch-erzeugnissen qualitativ nachweisen können.

2. H Ä M A G G L U T I N A T I O N

a) Allgemeines zur Methode

Die indirekte Hämagglutination ist eine der empfindlichsten serologischen Nachweismethoden. Während bei der direkten Hämagglutination Erythrozyten durch die direkte Einwirkung eines mikrobiellen Antigens verklumpen, wirken bei der indirekten Hämagglutination Immunsereen auf die roten Blutkörperchen, an die homologe Antigene adsorbiert worden sind.

Hämagglutinine sind Faktoren mit hämagglutininierenden Eigenschaften, die primär oder sekundär im Serum vorkommen.

Stoffe, die sich an die Oberfläche der Erythrozyten anheften lassen, bezeichnete CHENG (6) als "erythrozytensensibilisierende Substanzen", BOYDEN (3) als "Hämosensitine" und NETER (47) als "erythrozytenmodifizierende " Antigene. Sind solche Antigene an die Erythrozytenoberfläche fixiert worden, spricht man von "modifizierten oder sensibilisierten Erythrozyten".

Eine Fixierung von Proteinen kann nur dann stattfinden, wenn nach BOYDEN (3) Erythrozyten vorher mit Gerbsäure behandelt worden sind.

Die Vorgänge, die Antigene an die Erythrozytenoberfläche fixieren, sind noch nicht genau geklärt. Man vermutet jedoch, daß dabei "Rezeptoren" freigesetzt werden. Nach BOYDEN und GRABAR (4) handelt es sich bei diesen Rezeptoren um Lipide. Auch NETER (47) vermutet eine Lipoidstruktur dieser Rezeptoren. Nach HAYES und LANDY (22/45) können Erythrozyten mit verschiedenen Antigenen gleichzeitig "sensibilisiert" werden.

Bei der indirekten Hämagglutination unterscheidet man zwei Phasen: in der ersten Phase kommt es zur Sensibilisierung der Erythrozyten mit bestimmten Antigenen und in der zweiten bei Kontakt mit dem spezifischen Antiserum zur Agglutination der sensibilisierten Erythrozyten. Nach SCHMIDT (57) besteht das Wesen dieser Reaktion darin, daß die Antikörper nicht mit einem

Antigen reagieren, das primär den Erythrozyten zugeordnet ist, sondern mit einem solchen, das in einem der eigentlichen Reaktion vorausgehenden Vorgang adsorptiv an die Erythrozytenoberfläche gebunden ist. Die Erythrozyten sind also nur der Indikator der Antigen-Antikörper-Reaktion.

b) Spezielles zur Methode

Für die Durchführung dieser Reaktion benutzen die meisten Autoren Hammelblut, das über wenig Eigenagglutinine verfügt. Aber auch die Erythrozyten von Kaninchen, Meerschweinchen, Huhn, Maus und anderen Tieren können Verwendung finden. Dabei ist es wichtig für die Untersuchungen das Blut von ein und demselben Tier heranzuziehen. SPECK (60) konnte nachweisen, daß die Reaktionen bei der Verwendung verschiedener Blutspender kein einheitliches Ergebnis zeigten.

Das H a m m e l b l u t wird in einem, einige Glasperlen enthaltenden Erlenmeyerkolben aufgefangen, vorsichtig bis zum Erkalten ca. 15 min geschüttelt. Anschließend werden die Erythrozyten dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und über Nacht bei $+4 - 6^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank aufbewahrt. Zeigen die Erythrozyten nach dem zweiten Zentrifugieren keinerlei Anzeichen einer Hämolyse, so sind sie für die Reaktion brauchbar, da hämolytisch gewordene Erythrozyten die Sensibilisierung der Erythrozyten erheblich stören.

Für die S e n s i b i l i s i e r u n g werden 5 ml der gewaschenen Erythrozyten mit 17,5 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt und unter leichtem Schütteln 2,5 ml einer frisch angesetzten 0,1 % igen Tanninlösung zugegeben. Nach 15 min wird die Erythrozytenaufschwemmung abzentrifugiert und dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Das Sediment wird dann mit physiologischer Kochsalzlösung auf 25 ml aufgefüllt.

Die tanninbehandelten Erythrozyten werden für den Nachweis von Sojaprotein, aufgeschlossenem Milcheiweiß, Trockenblutplasma und Molkenprotein mit einer 0,5 % igen Eiweißlösung sensibilisiert. Die Konzentration für Ovalbumin beträgt 1,0 %, von Hühnereiweiß wird eine 25 %ige Lösung verwendet.

5 ml der jeweiligen Eiweißlösungen werden mit 10 Vol. % gewaschener nicht mit Tannin behandelter Hammelerythrozyten versetzt, nach 15 min abzentrifugiert und der klare Überstand weiter verwendet. Zu jeweils 5 ml tanninbehandelter Erythrozyten werden je 5 ml der so behandelten Eiweißlösungen zugegeben. Da die optimale Sensibilisierungstemperatur bei 37° C liegt, wird das Sensibilisierungsgemisch im Brutschrank inkubiert, nach 2 Stunden abzentrifugiert und dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Das Sediment wird mit physiologischer Kochsalzlösung auf 20 ml aufgefüllt.

Das vom Kaninchen durch Immunisierung gewonnene A n t i s e r u m wird 30 min im Wasserbad bei 56° C inkubiert und dreimal mit je 10 Vol. % der gewaschenen, nicht mit Tannin behandelten Erythrozyten abzentrifugiert.

1,0 ml Antiserum werden mit 0,5 ml des fraglichen Extraktes versetzt und 1 Stunde bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird zentrifugiert und der Überstand im Test verwendet.

Bei der Beurteilung der Reaktion betrachtet man das Erythrozytensediment am Boden der Reagenzgläser. Ist eine Agglutination eingetreten, so haben sich die Erythrozyten teppichartig über den Boden ausgebreitet.

Bei negativer Reaktion sedimentieren die Erythrozyten in den tiefsten Punkt des Röhrchens.

Je nachdem, in welchem Ausmaß das fragliche Material das geprüfte Fremdeiweiß enthält, kann eine Abschwächung des Agglutinationstiters, "Hämagglutinationshemmung", gegenüber den Kontrollen beobachtet werden. Je höher der Gehalt an Fremdeiweiß im Untersuchungsmaterial ist, um so stärker ist auch die Hämagglutinationshemmung.

C) Die indirekte Hämagglutination als Nachweisreaktion von Fremdeiweiß in erhitzten Fleischerzeugnissen

HERRMANN (31) wies in Anlehnung an die Untersuchungen von BOYDEN mit einer modifizierten indirekten Hämagglutination hitze-denaturiertes Hühnereiklar in Fleischwaren nach. In weiteren Untersuchungen konnte HERRMANN (36) den Zusatz von HE und aMe in bis auf 115° C erhitzten Fleischwaren in Konzentrationen ab 1,0% bzw. 0,1% quantitativ erfassen.

Nach KOTTER, HERRMANN und CORSICO (41) gestattet die indirekte Hämagglutination den quantitativen Nachweis von aMe in bis auf 115° C erhitzten Fleischerzeugnissen in Konzentrationen ab 0,1%.

KLUGE-WILM (39) stellte die Immunelektrophorese der indirekten Hämagglutination gegenüber, um mit beiden Methoden den quantitativen Nachweis von aMe in hocherhitzten Fleischwaren zu führen. Die Ergebnisse von HERRMANN (36) sowie KOTTER, HERRMANN und CORSICO (41) konnte sie nicht bestätigen.

ENOCH (14) verglich Agar-Gel-Diffusion, Immunelektrophorese und indirekte Hämagglutination auf ihre Eignung zum Nachweis von TBP in hocherhitzten Fleischwaren. Aufgrund ihrer Untersuchungsergebnisse gibt sie der indirekten Hämagglutination zum quantitativen Nachweis von TBP in hocherhitzten Fleischerzeugnissen den Vorzug.

Nach KOTTER und HERRMANN (41) ist die indirekte Hämagglutination für den quantitativen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß, Sojaprotein, Molkenprotein, Ovalbumin und Hühnereiklar in hocherhitzten Fleischerzeugnissen die Methode der Wahl.

DEGENKOLB und HINGERLE (12/13) führten ebenfalls Untersuchungen zum quantitativen Nachweis von Fremdeiweiß durch. Die Autoren halten jedoch die indirekte Hämagglutination aufgrund des großen Arbeitsaufwandes für Routineuntersuchungen in der Lebensmittelüberwachung als nicht geeignet und verwendeten diese Nachweismethode "in strittigen Einzelfällen".

3. Methoden zur Standardisierung der sensibilisierten Erythrozyten

KOTTER und HERRMANN (42) untersuchten Cialit und Nipagin auf ihre Eignung zur Konservierung von sensibilisierten Erythrozyten.

Mit Cialit (1:10 000) versetzte sensibilisierte Erythrozyten konnten 10 Wochen aufbewahrt werden, ohne die Reaktionen auffällig zu beeinträchtigen. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die so behandelten Erythrozyten hämolytisch und die Reaktion verlor deutlich an Spezifität und Empfindlichkeit.

Die mit Nipagin behandelten sensibilisierten Erythrozyten zeigten ähnliche Reaktionen. Die Reaktionsbeeinträchtigung trat jedoch bereits nach 6 Wochen auf. Die Autoren führen die schlechte Konservierung auf die unterschiedliche Löslichkeit des Nipagins zurück, da es im Sensibilisierungsgemisch immerwieder zu Konzentrationsverschiebungen gekommen war.

In der Literatur beschrieben mehrere Autoren die Konservierung der Hammelerythrozyten mit Formalin.

FLICK, COX und FINGERHUT, INGRAHAM und CZISMAS (16,8,38,9) verwendeten bei der Formalinisierung hochprozentige Formalinlösungen (10-50%). Diese hochprozentigen Formalinlösungen verursachten bei Kontakt mit der Erythrozytenaufschwemmung eine mehr oder weniger starke Hämolyse. Während DANIEL (10) die Methoden von INGRAHAM und CZISMAS kombinierte, benutzte er zur Formalinisierung nur eine 3,0%ige Lösung, statt wie INGRAHAM eine 10%ige Formalinlösung. Aufgrund der Behandlung der Erythrozyten mit Formalin kommt es zur Braunfärbung der Zellen, die aber keinen Einfluß auf die später durchzuführende Reaktion hat.

Über Haltbarkeit, Formbeständigkeit und Reaktionsvermögen der formalinisierten Erythrozyten berichten WEINBACH und CZISMAS, DANIEL und Mitarbeiter, WIDE und CZISMAS (68,9,10,67). WEINBACH und CZISMAS konnten an über ein Jahr lagernden Formolerythrozyten keine Formveränderungen beobachten. DANIEL und Mitarbeiter stellten nach 6 Wochen bei $+4^{\circ}\text{C}$ sowie bei -20°C aufbewahrten Erythrozyten, die formalinisiert waren, keinen Titerabfall fest. Dagegen kam es bei den bei Zimmertemperatur aufbewahrten Erythrozyten zu einem merklichen Aktivitätsverlust. Nach WIDE (67) bleiben die "sehr guten Reaktionsergebnisse" der formalinisierten Erythrozyten bei Aufbewahrung im Kühlschrank über 2-3 Monate dann erhalten, wenn nach jedem Gebrauch der Puffer über dem Erythrozytensediment erneuert wird. Ein Titerverlust von 75% trat nach zweimonatiger Lagerung bei Zimmertemperatur ein. INGRAHAM (38) berichtet über die Haltbarkeit formalinisierter Erythrozyten über 15 Monate ohne Verlust der serologischen Aktivität bei Aufbewahrung in verdünntem Formalin bei $+4^{\circ}\text{C}$.

4. Angewandte Immunisierungsmethoden

In letzter Zeit hat man sich immer mehr mit den immunologischen Eigenschaften der Fremdeiweiße beschäftigt.

KRÜGER und GROßKLAUS (44) geben einen umfassenden Überblick sowohl von den geübten Immunisierungsmethoden als auch von den unterschiedlichen Antigenaufbereitungsmethoden.

Als Serumspender verwendet DEGENKOLB und HINGERLE (12/13), CATSIMPOOLAS und MEYER (5) rassereine Kaninchen, während die Mehrzahl der Autoren (44,5,33) Bastarde benutzen. Alle Autoren geben als Mindestalter 6 Monate und als günstiges Gewicht mindestens 3 bis 3,5 kg an. Obwohl das Geschlecht der Tiere i.a. keine so ausschlaggebende Rolle spielt, gibt HERRMANN (33) den männlichen Tieren den Vorzug.

Das Antigen kann intracutan, subcutan, intramuskulär, intravenös oder intraperitoneal verabreicht werden. Sollen jedoch größere Mengen des Antigens injiziert werden, ist die intramuskuläre und subcutane Verabreichung zu bevorzugen. Bei der intracutanen, subcutanen, intramuskulären und der intraperitonealen Applikation wird das Antigen mehr oder weniger deponiert, während es bei der intravenösen Injektion direkt in die Blutbahn gelangt und somit sofort das gesamte RES direkt zur Bildung von Antikörpern anregt.

RING (54), KOTTER und Mitarbeiter (40), HERRMANN (33), sowie DEGENKOLB und HINGERLE (12/13) verabreichen große Mengen subcutan, während WARNECKE und SAFFLE (66) kleine Antigenmengen intramuskulär deponieren. FROMM (17) zieht die intravenöse Injektion den anderen Applikationsarten vor.

SINELL (59) und SINELL und KLUGE-WILM (61) kombinieren das intracutane Depot mit der intravenösen Infusion und verwendeten hierfür kleine Antigenmengen.

Die geschlossene Verabreichung der Gesamtdosis zeigt wesentlich schlechtere Ergebnisse als ihre fraktionierte Verabreichung in kleineren Dosen. KOTTER und Mitarbeiter (40) sowie FINGER (15) untersuchten die Zusammenhänge und weisen darauf hin, daß die Aufteilung der Gesamtdosis in kleinere Einzeldosen und deren schnelle Verabreichung in kurzen Intervallen (2Tage Rhythmus) zu einer besseren Antikörperbildung führt.

KOTTER und Mitarbeiter (40) verabreichen dem einzelnen Tier die Gesamtdosis des Antigens in 15 gleichgroßen Einzeldosen im Abstand von je zwei Tagen. Versuche, den Injektionsintervall auf fünf Tage zu erweitern, brachten schlechtere Ergebnisse.

DEGENKOLB und HINGERLE (12/13) bestätigen die Ergebnisse von KOTTER und Mitarbeiter. SINELL und KLUGE -WILM (61) teilen die Gesamtmenge Antigen in vier Einzeldosen auf; die erste und kleinste Dosis wird zu Beginn in Freund'schem Adjuvans emulgiert. Der andere Teil des Antigens wird an drei aufeinanderfolgenden Tagen appliziert. CATSIMPOOLAS und MEYER (5) immunisierten Kaninchen dreimal mit Sojaprotein im Abstand von 7 Tagen. WARNECKE und SAFFLE (66) berichten sowohl über die Injektion von sechs Einzeldosen, wobei 4 Injektionen in 2-tägigem Abstand verabreicht wurden und nach 10 Tagen weitere 2 Injektionen in 2-tägigem Abstand, als auch von 2 Injektionen an 2 aufeinanderfolgenden Tagen, gefolgt von 22 Tagen Ruhe und 2 anschließenden Injektionen.

Im engen Zusammenhang zur Verabreichungsart steht die Wahl der zur Immunisierung eingesetzten Hilfsstoffe.

KOTTER und Mitarbeiter (40), sowie DEGENKOLB und HINGERLE (12/13) benutzten Aluminiumhydroxyd in 1,5 % bzw. 0,75 %iger Suspension. CATSIMPOOLAS und MEYER (5), SINELL und Mitarbeiter (61), sowie WARNECKE und SAFFLE (66) verwenden zur vermehrten Antikörperbildung das Freund'sche Adjuvans.

a) Immunisierung mit erhitztem Antigen zur Gewinnung von
Antiseren gegen Fremdeiweiße

↳) Allgemeines

Nach H. SCHMIDT (58) muß ein Antigen sowohl Antikörper bilden, als auch mit diesen spezifisch reagieren können. Es gibt aber auch Antigene, die nur eine dieser Fähigkeiten besitzen. SCHMIDT (58) unterteilt deshalb die Antigene in Vollantigen, Hapten, Halbhapten und determinante Gruppe.

Das Vollantigen ist entweder selbst ein Eiweiß oder ein hochmolekulares Abbauprodukt von Eiweiß. Trotzdem ist nicht jedes Eiweiß Antigen (57). Ein Teil des Vollantigens ist Träger der Fähigkeit, Antigene zu bilden, ein anderer Teil verkörpert die determinante Gruppe, die die Spezifität bei der Antikörperbildung bestimmt.

Eine genaue Definition für ein Antigen besteht zur Zeit noch nicht. Bei der Erstellung " künstlicher " Antigene wurde jedoch festgestellt, daß für seine Antigenität ein Molekulargewicht von 2000 nicht unterschritten werden darf (57).

Werden die Antigene parenteral geeigneten Tieren, z.B. Kaninchen und Pferden einverleibt, so bilden diese Antikörper gegen das Antigen als Fremdeiweiß.

Bleibt die Antigen- Menge gering, so ist die Menge der Antikörper der Antigen-Menge proportional. Wird jedoch die Antigenmenge gesteigert, so erreicht der Titer eine Grenze, die durch Erhöhung der Antigen-Menge und der Behandlungsdauer nicht überschritten wird (57).

β) Antigenaufbereitungsmethoden

Die für die Immunisierung benutzten Antigene werden erhitzt, um Antiseren herzustellen, die es ermöglichen, auch mit dem Material zu reagieren, welches über 70° C erhitzt worden ist.

Das Antigen wirkt bei der Synthese des Antikörpers im Sinne einer Matrize(57). Mittels seiner determinanten Gruppe greift das Antigen in die Globulinbildung ein. PAULING, PRESSMANN und HAURWITZ (51,52,23,24,25) unterstützten später diese Theorie durch weitere Untersuchungen.

SCHMIDT (56) konnte mit seinem "Hitze-Alkali-Präzipitin" bei nativem als auch bei bis auf 100° C erhitztem Material noch positive Reaktionen beobachten.

DEGENKOLB und HINGERLE (12/13) immunisierten Kaninchen mit einer 10%igen Antigenlösung, die vorher 30min im Wasserbad auf 75° C erhitzt worden ist.

HERRMANN (33) hält das "Hitze-Alkali-Präzipitin" nach Schmidt am geeignetsten. Dabei wird der Eiweißextrakt 30min auf 70° C erhitzt, anschließend mit 1/n NaOH versetzt, mit 1/n HCL neutralisiert und schließlich nochmals 15min im Wasserbad erhitzt. Als Antigenlösungen dienen für den Nachweis eine 10%ige Sojaproteinlösung, für Molkenprotein eine 10%ige Laktalbuminlösung, für Hühnereiklar eine 20%ige Hühnereiklarlösung.

Um wirksame Antiseren gegen Sojaprotein zu erhalten, wurde nach HERRMANN (33) aufbereitetes Sojabohnenmehl verwendet.

DEGENKOLB und HINGERLE benutzten isoliertes Sojaprotein.

Die Antiseren, die durch Immunisieren mittels des "Hitze-Alkali-Präzipitins" gewonnen worden sind, besitzen i.a. einen geringen Titer. Um die Antikörperbildung zu steigern, verwendeten RING (54) sowie KOTTER und Mitarbeiter neben "Hydrolysaten" von erhitztem Eiweiß Metallverbindungen, wie Aluminiumhydroxyd, Alaun sowie Eisen-III-chlorid.

HERRMANN (33) verwendet zur Immunisierung die entsprechende Antigenlösung in einer 1,5%igen Aluminiumhydroxydsuspension. Eine andere Aufbereitung der Antigene zur Immunisierung versuchten KRÜGER und GROßKLAUS (44). Von Sojaprotein und Sojavollmehl wurde eine 10%ige Aufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung 24 Stunden bei $+4^{\circ}$ C im Kühlschrank gehalten, 10min mit 2000 U abzentrifugiert und der opalisierende Überstand weiter verwendet. Ein Teil des Extraktes wurde unerhitzt in Flaschen abgefüllt und lyophilisiert (Nativextrakt); ein Teil wurde 30min auf 75° C erhitzt, ein weiterer 30min auf 110° C. Der letzte Teil wurde nach dem "Hitze-Alkali-Präzipitin" hergestellt.

Der Hälfte der so behandelten Antigene wurde vor der Lyophilisation 1,5%iges Aluminiumhydroxyd Nr.1088 der Firma Merck zugesetzt. Dabei zeigte sich, daß ein nativ belassenes Sojavollmehl zur Antikörperbildung wesentlich schlechter geeignet war, als ein aufbereitetes Sojaproteinpräparat.

5. Extraktionsverfahren

Bereits W.A. SCHMIDT (56) wies auf die Bedeutung der Extraktion des Antigens für serologische Untersuchungen hin und schreibt die begrenzte serologische Aktivität von erhitztem Eiweiß nicht in erster Linie der Hitzemodifikation zu. In den Fällen, in denen das Eiweiß infolge des Erhitzens völlig unlöslich geworden sei, sei "der Anwendung der Präzipitinmethode in der Praxis leider allzuoft eine Grenze gesetzt".

Die bisher beschriebenen Extraktionsverfahren unterscheiden sich in Extraktionsdauer, Extraktionstemperatur sowie Lösungsmittel und -menge, pH-Wert des Lösungsmittels, Zerkleinerungsgrad und unterschiedliche Vorbehandlung des Untersuchungsgutes, z.B. durch Dialyse und Lyophilisation.

SINELL und KLUGE - WILM (61) zerkleinern im Ultra-Turrax ca. 100g Untersuchungsmaterial, 5g davon versetzen sie mit 5 ml kochender physiologischer Kochsalzlösung. Nach kräftigem Schütteln extrahieren sie 24 Stunden bei Zimmertemperatur und zentrifugieren den Extrakt 30 min bei 5000 Umdrehungen ab.

DEGENKOLB und HINGERLE (12/13) bestimmen vor der Extraktion Wasser- und Fettgehalt des Untersuchungsmaterials und geben dem zerkleinerten Material je nach Wassergehalt 5 ml physiologische Kochsalzlösung und 2 ml 1n NaOH zu. Das Material wird unter öfterem Umrühren 2 Stunden im Wasserbad bei 50° C extrahiert und im Ultra-Turrax 30 sec bei 24 000 U /min homogenisiert, der pH-Wert auf 7,5 eingestellt und nochmals 30 sec im Ultra-Turrax homogenisiert. Anschließend wird das Extraktionsgemisch 10 min bei 4000 U /min zentrifugiert und der überstehende Extrakt abgesaugt.

GÜNTHER (19) verreibt 5 bzw. 10g Untersuchungsmaterial im Mörser mit 7-14 ml Barbitalspuffer (pH-Wert 8,2), der Mörser wird mit 3-6 ml Puffer ausgespült und nach gründlichem Mischen wird die Lösung 2 Stunden bei 40° C im Brutschrank extrahiert. Nach dem Zentrifugieren bei 20 000 U /10 min wird der Überstand mit Hilfe eines technischen Faltenfilters filtriert.

KOTTER und HERRMANN (42) beschrieben zwei Extraktionsmethoden, je nach den Untersuchungsanforderungen. Für den qualitativen Nachweis von Fremdeiweiß wird das Untersuchungsmaterial im Starmix fein zerkleinert und im Verhältnis 1:2 mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Nach der Extraktion wird das Material 15 min bei mindestens 3000 U / min abzentrifugiert. Für den quantitativen Nachweis wird das Untersuchungsmaterial fein zerkleinert und lyophilisiert. Das Lyophilisat wird mit physiologischer Kochsalzlösung 48 Stunden bei $+ 4 - 6^{\circ} \text{C}$ im Kühlschrank extrahiert, abzentrifugiert und das Zentrifugat durch Gaze filtriert.

C) E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

I. Prüfung verschiedener Konservierungsmittel auf ihre Eignung als Zusatz zu sensibili- sierten Hammelerythrozyten.

In den Untersuchungen wurde geprüft, ob durch den Zusatz der Konservierungsmittel Cialit⁺, Baycovin⁺⁺ und Merthiolat⁺⁺⁺ Erythrozyten über eine längere Zeit haltbar gemacht werden können.

Nach erfolgter Sensibilisierung mit Sojaprotein wurden den Erythrozyten die Konservierungsmittel zugesetzt und dann in Abständen von 5, 10, 15, 21 und 30 Tagen nach dem Ansatz die Aktivität der so behandelten sensibilisierten Hammelerythrozyten in der Reaktion geprüft.

Die S E N S I B I L I S I E R U N G der Hammelerythrozyten wurde wie folgt durchgeführt:

H A M M E L B L U T wird mit einer Schüttelflasche mit Glasperlen aufgefangen und vorsichtig bis zum Erkalten (ca. eine Viertelstunde) geschüttelt. Anschließend wird das Blut zentrifugiert und die Erythrozyten dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Das Erythrozytensediment wird über Nacht im Kühlschrank bei $+4 - 6^{\circ} \text{C}$ aufbewahrt.

Für die T A N N I N B E H A N D L U N G werden 5 ml der gewaschenen Hammelerythrozyten mit 17,5 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt und unter leichtem Schütteln 2,5 ml einer frisch angesetzten 0,1 %igen Tanninlösung zugegeben. Die Erythrozytenaufschwemmung wird nach 15 min zentrifugiert und das Zentrifugat so oft mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, bis der Überstand klar bleibt. Das Erythrozytensediment wird im Meßzylinder mit physiologischer Kochsalzlösung auf 25 ml aufgefüllt.

Zur S E N S I B I L I S I E R U N G der tanninbehandelten Hammelerythrozyten werden 6 ml einer 0,5 %igen Sojaproteinlösung mit

10 Vol. % gewaschenen nicht mit Tannin behandelten Hammelerythrozyten versetzt, nach 15 min abzentrifugiert und der klare Überstand verwendet. Zu 5 ml so behandelter Eiweißlösung werden 5 ml tanninbehandelte Hammelerythrozyten hinzugefügt, 2 Stunden im Brutschrank bei 37⁰ C inkubiert, abzentrifugiert und das Sediment mindestens dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Das letzte Sediment wird auf 20 ml mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt.

Für die Untersuchungen wurden die Erythrozytenaufschwemmungen mit verschiedenen Konzentrationen von Merthiolat, Baycovin und Cialit versetzt, in Ampullen abgefüllt und im Kühlschrank bei +4 - 6⁰ C gelagert.

Cialit⁺ Firma Asid

Baycovin ⁺⁺ Firma Bayer

Merthiolat⁺⁺⁺ Firma Schuchardt

TABELLE I

Prüfung der mit Cialit⁺ konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten nach 5, 10, 15, 21 und 30 Tagen

2 4 8 16 32 64 128 256 512 1024 2048 4096 8192 16364 32728 65456

pos. Serum-

kontrolle

Cz 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Ck 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
Cz 10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
Ck 10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
Cz 15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
Ck 15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
Cz 21	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
Ck 21	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
Cz 30	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
Ck 30	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
	völlige															
	völlige															
	Hämolyse															
	Hämolyse															

Zeichenerklärung : Cialit⁺ = eine 0,05 %ige Cialitlösung

pos. Serumkontrolle = Antikörperbestimmung

Cz 5 = Cialit zentrifugiert nach 5 Tagen	Cz 21 = Cialit zentrifugiert nach 21 Tagen
Ck 5 = Cialit konserviert nach 5 Tagen	Ck 21 = Cialit konserviert nach 21 Tagen
Cz 10 = Cialit zentrifugiert nach 10 Tagen	Cz 30 = Cialit zentrifugiert nach 30 Tagen
Ck 10 = Cialit konserviert nach 10 Tagen	Ck 30 = Cialit konserviert nach 30 Tagen
Cz 15 = Cialit zentrifugiert nach 15 Tagen	
Ck 15 = Cialit konserviert nach 15 Tagen	

TABELLE II

Prüfung der mit Merthiolat⁺ konservierten, sensibilisierten Hammelerthozyten nach 5, 10, 15, 21, u. 30 Tagen

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456	130912
pos. Serum - kontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Mz 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+		
Mk 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+		
Mz 10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+		
Mk 10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+				
Mz 15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+						
Mk 15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+						
Mz 21	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+							
Mk 21	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++								
Mz 30	V	Ü	l	l	i	g	e	H	ä	m	o	l	y	s	e		
Mk 30	V	Ü	l	l	i	g	e	H	ä	m	o	l	y	s	e		

Zeichenerklärung: Merthiolat⁺ = eine 0,05 %ige Merthiolatlösung

positive Serumkontrolle = Antikörperbestimmung

Mk 5 = Merthiolat konserviert nach 5 Tagen

Mz 5 = Merthiolat zentrifugiert nach 5 Tagen

Mk 10 = Merthiolat konserviert nach 10 Tagen

Mz 10 = Merthiolat zentrifugiert nach 10 Tagen

Mk 15 = Merthiolat konserviert nach 15 Tagen

Mz

Mk

Mz

Mk

15

21

21

30

= Merthiolat zentrifugiert nach 15 Tagen

= Merthiolat konserviert nach 21 Tagen

= Merthiolat zentrifugiert nach 21 Tagen

= Merthiolat konserviert nach 30 Tagen

+

26

+

TABELLE III

Prüfung der mit Baycovin⁺ konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten nach 5, 10, 15, 21, und 30 Tagen

pos. Serum- kontrolle	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456	
Bz 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Bk 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Bz 10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Bk 10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Bz 15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Bk 15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Bz 21	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Bk 21	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
																	hämolytisch
																	hämolytisch

Zeichenerklärung: Baycovin⁺ = eine 0,05 %ige Baycovinlösung

positive Serumkontrolle = Antikörperbestimmung

Bz 5 = Baycovin zentrifugiert nach 5 Tagen
 Bk 5 = Baycovin konserviert nach 5 Tagen
 Bz 10 = Baycovin zentrifugiert nach 10 Tagen
 Bk 10 = Baycovin konserviert nach 10 Tagen
 Bz 15 = Baycovin zentrifugiert nach 15 Tagen
 Bk 15 = Baycovin konserviert nach 15 Tagen
 Bz 21 = Baycovin zentrifugiert nach 21 Tagen
 Bk 21 = Baycovin konserviert nach 21 Tagen

TABELLE IV

Prüfung der mit Cialit⁺ konservierten, sensibilisierten Hammelerthrozyten nach 5, 10, 15, 21, 30 Tagen

pos. Serum-
kontrolle 2 4 8 16 32 64 128 256 512 1024 2048 4096 8192 16384 65456 130912

Cz 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Ck 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Cz 10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Ck 10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Cz 15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Ck 15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Cz 21	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Ck 21	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Cz 30	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Ck 30	+++	++	+													

hämolytisch

Zeichenerklärung : Cialit⁺ = eine 0,07 % ige Cialitlösung

positive Serumkontrolle = Antikörperbestimmung

Cz 5= Cialit zentrifugiert nach 5 Tagen

Ck 5= Cialit konserviert nach 5 Tagen

Cz 10= Cialit zentrifugiert nach 10 Tagen

Ck 10= Cialit konserviert nach 10 Tagen

Cz 15= Cialit zentrifugiert nach 15 Tagen

Ck 15= Cialit konserviert nach 15 Tagen

Cz 20= Cialit zentrifugiert nach 20 Tagen

Ck 21= Cialit konserviert nach 21 Tagen

Cz 30= Cialit zentrifugiert nach 30 Tagen

Ck 30= Cialit konserviert nach 30 Tagen

TABELLE V

Prüfung der mit Baycovin⁺ konservierten, sensibilisierten Hammelerthozyten nach 5, 10, 15, 21 Tagen

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456	130912
pos. Serum-																	
kontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Bz 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+				
Bk 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+				
Bz 10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+				
Bk 10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+				
Bz 15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+				
Bk 15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+				
Bz 21	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+				
Bk 21	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+				
Bz 30	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+				
Bk 30	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+				

Zeichenerklärung : Baycovin⁺ = eine 0,07 %ige Baycovinlösung

positive Serumkontrolle = Antikörperbestimmung

Bz 5 = Baycovin zentrifugiert nach 5 Tagen

Bk 5 = Baycovin konserviert nach 5 Tagen

Bz 10 = Baycovin zentrifugiert nach 10 Tagen

Bk 10 = Baycovin konserviert nach 10 Tagen

Bz 15 = Baycovin zentrifugiert nach 15 Tagen

Bk 15 = Baycovin konserviert nach 15 Tagen

Bz 21 = Baycovin zentrifugiert nach 21 Tagen

Bk 21 = Baycovin konserviert nach 21 Tagen

Bz 30 = Baycovin zentrifugiert nach 30 Tagen

Bk 30 = Baycovin konserviert nach 30 Tagen

TABELLE VI

Prüfung der mit Merthiolat konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten nach 5, 10, 15, 21, 30 Tagen

pos. Serum- kontrolle	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456	130912
Mz 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Mk 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+							
Mz 10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+							
Mk 10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++								
Mz 15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+							
Mk 15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+								
Mz 21	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+										
Mk 21	+++	+++	+++	+++	++	+											
Mz 30	+++	+++	++	+													
Mk 30	+++	++	+														

1 30 1

Zeichenerklärung : Merthiolat* = eine 0,07 % ige Merthiolatlösung

pos. Serumkontrolle = Antikörperbestimmung

Mz 5	= Merthiolat zentrifugiert nach 5 Tagen	Mz 21	= Merthiolat zentrifugiert nach 21 Tagen
Mk 5	= Merthiolat konserviert nach 5 Tagen	Mk 21	= Merthiolat konserviert nach 21 Tagen
Mz 10	= Merthiolat zentrifugiert nach 10 Tagen	Mz 30	= Merthiolat zentrifugiert nach 30 Tagen
Mk 10	= Merthiolat konserviert nach 10 Tagen	Mk 30	= Merthiolat konserviert nach 30 Tagen
Mz 15	= Merthiolat zentrifugiert nach 15 Tagen		
Mk 15	= Merthiolat konserviert nach 15 Tagen		

Prüfung der mit Cialit⁺ konservierten, sensibilisierten Hammelerthrozyten nach 5, 10, 15, 21 Tagen

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384
positive Serum--														
kontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+

Cz 5 +++ +++ +++ +++ +++ +++ ++ +

Ck 5 +++ +++ +++ +++ +++ ++ +

Cz 10 +++ +++ +++ ++ +

Ck 10 +++ +++ ++ +

Cz 15 +++ ++ +

Ck 15 +++ ++ +

Cz 21 ++ +

Ck 21 ++ +

Zeichenerklärung: Cialit⁺ = eine 0,12% ige Cialitlösung

positive Serumkontrolle = Antikörperbestimmung

Cz 5 = Cialit zentrifugiert nach 5 Tagen

Ck 5 = Cialit konserviert nach 5 Tagen

Cz 10 = Cialit zentrifugiert nach 10 Tagen

Ck 10 = Cialit konserviert nach 10 Tagen

Cz 15 = Cialit zentrifugiert nach 15 Tagen

Ck 15 = Cialit konserviert nach 15 Tagen

Cz 21 = Cialit zentrifugiert nach 21 Tagen

Ck 21 = Cialit konserviert nach 21 Tagen

TABELLE VIII

Prüfung der mit Merthiolat⁺ konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten nach 5, 10, 15, 21 Tagen

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384
pos. Serum- kontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Mz 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+			
Mk 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+					
Mz 10	+++	+++	+++	+++	+++	++	+							
Mk 10	+++	+++	+++	+++	++	+								
Mz 15	+++	+++	+++	+++	++	+								
Mk 15	+++	+++	+++	++	+									
Mz 21	+++	+++	++	+										
Mk 21	+++	++	+											

- 32 -

Zeichenerklärung : Merthiolat⁺ = eine 0,12 %ige Merthiolatlösung

positive Serumkontrolle = Antikörperbestimmung

Mz 5 = Merthiolat zentrifugiert nach 5 Tagen

Mk 5 = Merthiolat konserviert nach 5 Tagen

Mz 10 = Merthiolat zentrifugiert nach 10 Tagen

Mk 10 = Merthiolat konserviert nach 10 Tagen

Mz 15 = Merthiolat zentrifugiert nach 15 Tagen

Mk 15 = Merthiolat konserviert nach 15 Tagen

Mz 21 = Merthiolat zentrifugiert nach 21 Tagen

Mk 21 = Merthiolat konserviert nach 21 Tagen

TABELLE IX

Prüfung der mit Baycovin⁺ konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten nach 5, 10, 15, 21 Tagen

pos.Serum- kontrolle	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192
'	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Bz 5	+++	+++	+++	+++	+++	++	+						
Bk 5	+++	+++	+++	+++	++	+							
Bz 10	+++	+++	++	+									
Bk 10	+++	+++	++	+									
Bz 15	+++	++	+										
Bk 15	+++	++	+										
Bz 21	++	+											
Bk 21	+	+											

Zeichenerklärung : Baycovin⁺ = eine 0,12 %ige Baycovinlösung

positive Serumkontrolle = Antikörperbestimmung

Bz 5 = Baycovin zentrifugiert nach 5 Tagen

Bk 5 = Baycovin konserviert nach 5 Tagen

Bz 10 = Baycovin zentrifugiert nach 10 Tagen

Bk 10 = Baycovin konserviert nach 10 Tagen

Bz 15 = Baycovin zentrifugiert nach 15 Tagen

Bk 15 = Baycovin konserviert nach 15 Tagen

Bz 21 = Baycovin zentrifugiert nach 21 Tagen

Bk 21 = Baycovin konserviert nach 21 Tagen

TABELLE X

Prüfung der mit Ciallit⁺ konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten nach 5, 10, 15, 21 Tagen

pos. Serum- kontrolle	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
Cz 5	+++	+++	+++	+++	+++	++	+								
Ck 5	+++	+++	+++	+++	++	+									
Cz 10	+++	+++	+++	++	+										
Ck 10	+++	+++	+++	++	+										
Cz 15	+++	+++	++	+											
Ck 15	+++	++	+												
Cz 21	++	+													
Ck 21	+	+													

Zeichenerklärung : Ciallit⁺ = eine 0,14 %ige Ciallitlösung

pos. Serumkontrolle = Antikörperbestimmung

Cz 5 = Ciallit zentrifugiert nach 5 Tagen

Ck 5 = Ciallit konserviert nach 5 Tagen

Cz 10 = Ciallit zentrifugiert nach 10 Tagen

Ck 10 = Ciallit konserviert nach 10 Tagen

Cz 15 = Ciallit zentrifugiert nach 15 Tagen

Ck 15 = Ciallit konserviert nach 15 Tagen

Cz 21 = Ciallit zentrifugiert nach 21 Tagen

Ck 21 = Ciallit konserviert nach 21 Tagen

TABELLE XI

Prüfung der mit Merthiolat⁺ konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten nach 5, 10, 15, 21 Tagen

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
pos. Serum- kontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Mz 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+					
Mk 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+						
Mz 10	+++	+++	+++	+++	+++	++	+								
Mk 10	+++	+++	+++	+++	+++	++	+								
Mz 15	+++	+++	+++	++	+										
Mk 15	+++	+++	++	+											
Mz 21	+++	++	+												
Mk 21	++	+													

Zeichenerklärung : Merthiolat⁺ = eine 0,14 %ige Merthiolatlösung

positive Serumkontrolle = Antikörperbestimmung

Mz 5	= Merthiolat zentrifugiert nach 5 Tagen
Mk 5	= Merthiolat konserviert nach 5 Tagen
Mz 10	= Merthiolat zentrifugiert nach 10 Tagen
Mk 10	= Merthiolat konserviert nach 10 Tagen
Mz 15	= Merthiolat zentrifugiert nach 15 Tagen
Mk 15	= Merthiolat konserviert nach 15 Tagen
Mz 21	= Merthiolat zentrifugiert nach 21 Tagen
Mk 21	= Merthiolat konserviert nach 21 Tagen

TABELLE XII

Prüfung der mit Baycovin⁺ konservierten, sensibilisierten Hammelerthrozyten nach 5, 10, 15, 21, 30 Tagen

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728
pos. Serum kontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Bz 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+							
Bk 5	+++	+++	+++	+++	+++	++	+								
Bz 10	+++	+++	+++	+++	++	+									
Bk 10	+++	+++	+++	++	+										
Bz 15	+++	+++	++	+											
Bk 15	+++	+++	++	+											
Bz 21	+++	++	+												
Bk 21	++	+													

Zeichenerklärung : Baycovin⁺ = eine 0,14 %ige Baycovinlösung

positive Serumkontrolle = Antikörperbestimmung

Bz 5 = Baycovin zentrifugiert nach 5 Tagen

Bk 5 = Baycovin konserviert nach 5 Tagen

Bz 10 = Baycovin zentrifugiert nach 10 Tagen

Bk 10 = Baycovin konserviert nach 10 Tagen

Bz 15 = Baycovin zentrifugiert nach 15 Tagen

Bk 15 = Baycovin konserviert nach 15 Tagen

Bz 21 = Baycovin zentrifugiert nach 21 Tagen

Bk 21 = Baycovin konserviert nach 21 Tagen

Besprechung der Ergebnisse

Wie aus Tabelle I zu ersehen ist, trat bei den mit 0,05 % Cialit konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten bereits nach 5 Tagen ein Aktivitätsverlust um zwei Verdünnungsstufen auf, der nach 10 Tagen 4, nach 15 Tagen 5 und nach 21 Tagen 6 Stufen betrug. Dabei wurde leichte Hämolyse beobachtet. Nach 30 Tagen war die Reaktion völlig hämolytisch. Die in der Cialitaufschwemmung benutzten sensibilisierten Hammelerythrozyten reagierten durchweg schlechter als die nach vorangegangener Zentrifugation in physiologischer Kochsalzlösung erneut aufgeschwemmten sensibilisierten Hammelerythrozyten.

Nach den Untersuchungsergebnissen in Tabelle II zeigten die mit 0,05 % Merthiolat konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten einen ähnlichen Aktivitätsverlust. Zum Unterschied der mit Cialit konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten reagierte jedoch das mit Merthiolat versetzte Erythrozytengemisch geringgradig besser als die erneut mit physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmten sensibilisierten Erythrozyten.

Die mit Baycovin konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten (Tabelle III) zeigten erst nach 21 Tagen einen Aktivitätsverlust um zwei Verdünnungsstufen. Allerdings war nach dieser Zeit die Reaktion bereits hämolytisch.

Im weiteren wurden unterschiedliche Konzentrationen der Konservierungsmittel den sensibilisierten Hammelerythrozyten zugegeben. Die so behandelten sensibilisierten Hammelerythrozyten wurden dann mit verschiedenen Antiseren auf ihre Aktivität in der indirekten Hämagglutination geprüft.

Die Untersuchungsergebnisse aus Tabelle I-XII zeigen, daß der Aktivitätsverlust der konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten abhängig von dem Antiserumtiter ist, d.h. je geringer die Titerhöhe der Antiseren, um so größer ist der Aktivitätsverlust der konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten in der Reaktion.

Beim Vergleich des Einflusses der Konzentrationshöhe der Konservierungsmittel zeigt sich bei allen Konservierungsmitteln die Konzentration von 0,1 % als am besten geeignet. Alle höher liegenden Konzentrationen beschleunigen den Aktivitätsverlust.

1. Prüfung verschiedener Konservierungsmittel in steriler Alserverseher Lösung aufgeschwemmten sensibilisierten Hammelerythrozyten

Die in Alserverseher Lösung aufgeschwemmten sensibilisierten Hammelerythrozyten mit den in unterschiedlichen Konzentrationen zugeführten Konservierungsmitteln Cialit, Merthiolat und Baycovin zeigten bereits nach 8 Tagen starke Hämolyse, so daß auf eine weitere Prüfung verzichtet wurde.

2. Aufbewahrung der sensibilisierten Hammelerythrozyten in handelsüblichen Blutkonserven

Die sensibilisierten Hammelerythrozyten wurden in einer Blutkonserve⁺ aufgeschwemmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle XIII aufgezeichnet.

⁺ Firma Asid und Firma Biotest

TABELLE XIII

Aufbewahrung der sensibilisierten Hammelerythrozyten in handelsüblichen Blutkonserven

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384
pos. Serum- kontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
nach 1 Woche	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+
nach 2 Wochen	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+
nach 3 Wochen	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+
nach 4 Wochen	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+
nach 5 Wochen	+++	+++	+++	+++	+++	+	starke Hämolyse							
nach 6 Wochen	+++	+++	+++	++	+		"	"						
nach 7 Wochen	völlig hämolytisch													

Ergebnisse

Wie Tabelle XIII zeigt, war bis zur 3. Woche kein Aktivitätsverlust der sensibilisierten Hammelerythrozyten zu beobachten, jedoch war anschließend bei den Reaktionen eine zunehmende Hämolyse zu beobachten, die mit einem starken Aktivitätsverlust verbunden war.

II. Verwendung formalinisierten Hammelerythrozyten zur Sensibilisierung mit Sojaprotein

Da die mit den geprüften Konservierungsmitteln mit Sojaprotein sensibilisierten Hammelerythrozyten nicht für längere Zeit zu konservieren waren, wurden native Hammelerythrozyten vor ihrer Sensibilisierung mit Sojaprotein nach den Angaben von WEINBACH (68) sowie WIDE und GEMZELL (67) formalinisiert.

1. Formalinisierung der Hammelerythrozyten

H a m m e l b l u t wird zu gleichen Teilen in Alserverscher Lösung aufgefangen und bis zu seiner Verwendung bei + 4° C aufbewahrt.

Für die F o r m a l i n i s i e r u n g werden die Erythrozyten dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Ein Volumen einer 8%igen Zellsuspension wird mit einem Volumen 3%iger Formalinlösung (ph 7,0 -7,5) 18-20 Std. bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Das Formalin wird anschließend durch viermaliges Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung entfernt.

Für die T a n n i n b e h a n d l u n g werden die Erythrozyten mit einer gepufferten NaCl-Lösung (pNaCl) auf 3,3% verdünnt und mit gleichem Volumen einer 1: 40 000 verdünnten Tanninlösung versetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37° C werden die Erythrozyten zweimal mit pNaCl gewaschen.

Zur S e n s i b i l i s i e r u n g wird das tanninbehandelte Erythrozytensediment mit pNaCl (ph 6,4) auf eine 3,3%ige Zellsuspension aufgeschwemmt, die mit gleichem Volumen einer Antigenlösung versetzt, 1 Stunde bei 37° C unter öfterem Umrühren inkubiert. Nach der Inkubation wird die Erythrozyten- Antigen- Aufschwemmung zweimal mit pNaCl gewaschen.

Das letzte Sediment wird mit pNaCl auf eine 10%ige Konzentration verdünnt und mit 1%igem normalen Kaninchenserum sowie

Merthiolat 1: 10 000 versetzt und im KÜHLSCHRANK bei $+4 - 6^{\circ}$ C aufbewahrt.

2. Antigenherstellung und Antiserumgewinnung

Das Antigen wurde nach dem " Hitze-Alkali-Präzipitin " von W.A. SCHMIDT (56) hergestellt. Für die eigenen Versuche verwendete ich " EDI PRO N " ⁺. Die 10%ige Sojaeiweißlösung wurde eine halbe Stunde auf 70° C erhitzt, mit 1n Natronlauge versetzt und mit 1n Salzsäure neutralisiert und anschließend nochmals 15 min im Wasserbad auf 70° C erhitzt.

Zur I m m u n i s i e r u n g wurden jeweils 10 ml einer 10%igen Sojaeiweißlösung in einer 1,5%igen Aluminiumhydroxydsuspension in Abständen von zwei Tagen einem Kaninchen ca. 10 -15 mal s.c. injiziert.

Zur S e r u m g e w i n n u n g wurden die Kaninchen durch Herzpunktion entblutet; das Blut bei Zimmertemperatur stehen gelassen und nach dem vorsichtigen Lösen des Blutkuchens vom Glasrand über Nacht bei $0 - +4^{\circ}$ C im KÜHLSCHRANK aufbewahrt. Am nächsten Morgen wurde das überstehende Serum abgegossen, abzentrifugiert und anschließend zur besseren Haltbarkeit lyophilisiert. Vor Gebrauch wurde das Antiserum 30 min bei 56° C inaktiviert.

3. Ermittlung geeigneter Sojaproteinkonzentrationen für die Sensibilisierung formalinisierten Hammelerythrozyten.

Zur Ermittlung der geeigneten Konzentration der Sojaeiweißlösung zur Sensibilisierung der formalinisierten Hammelerythrozyten-

⁺ Firma Ralston Purina GmbH

throzyten wurden verschieden konzentrierte Sojaproteinlösungen geprüft und in der indirekten Hämagglutination gegen ein bekanntes Antiserum ausstitriert.

- a) Durchführung der indirekten Hämagglutination mit formalinisierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten

In Reagenzgläsern werden 0,5 ml NaCl (ph 7,2) vorgelegt und 0,5 ml Antiserum durch Überpipettieren quadratisch verdünnt. Jedem Reagenzglas werden 0,06 - 0,065 ml der sensibilisierten Erythrozyten zugegeben. Die Gläschen werden aufgeschüttelt und nach 2 Stunden Stehenlassens bei Zimmertemperatur abgelesen. Die Reaktion wird mit Hilfe eines um 45° geneigten Spiegels abgelesen und wie folgt beurteilt:

- +++ Boden des Röhrchens mit einem gleichmäßigen Erythrozytentepich bedeckt; die Ränder können glatt oder eingerissen sein (positive Agglutination).
- + Schmäler Erythrozytenring um einen glatten Zellteppich. (positive Agglutination).
- Scharf abgesetzter Ring oder Knopfbildung der sedimentierten Erythrozyten (negative Agglutination).

Die Reaktionsergebnisse der zur Sensibilisierung formalinisierter Hammelerythrozyten benutzten unterschiedlichen Sojaproteinkonzentrationen sind in Tabelle XIV zusammengefaßt.

TABELLE XIV

Versuche zur Ermittlung der optimalen Eiweißkonzentrationen zur Sensibilisierung der Erythrozyten

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	65536	131072
pos. Serumkontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
neg. Serumkontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sj 0,01	+++	+++	+++	+++	++	+											
Sj 0,02	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+								
Sj 0,03	+++	+++	+++	++	+												
Sj 0,04	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+				
Sj 0,05	+++	+++	+++	++	+												
Sj 0,06	+++	+++	++	+													
Sj 0,07	+++	+++	++	+													
Sj 0,08	+++	+++	+++	+++	++	+											
Sj 0,09	+++	++	+														
Sj 0,1	+++	+++	+++	+++	++	++	+										
Sj 0,12	+++	+++	+++	+++	+++	++	+										
Sj 0,13	+++	+++	+++	+++	++	+											
Sj 0,14	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+								
Sj 0,15	+++	+++	+++	+++	+++	++	+										

Fortsetzung zu Tabelle XIV

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	65536	131072
Sj 0,16	+++	+++	+++	+++	++	+											
Sj 0,17	+++	+++	+++	++	+												
Sj 0,18	+++	+++	+++	++	+												
Sj 0,19	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+							
Sj 0,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+						
Sj 0,21	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+						
Sj 0,22	+++	+++	+++	+++	++	++	+										
Sj 0,23	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+								
Sj 0,24	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+		
Sj 0,25	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+

Zeichenerklärung :

positive Serumkontrolle = Antikörperbestimmung

negative Serumkontrolle = negativer Serumentiter = Sj 2,5% = eine 2,5 %ige Sojaproteinlösung in physiologischer Kochsalzlösung.

Sj ... % = eine ... %ige Sojaproteinlösung in physiologischer Kochsalzlösung

Ergebnisse

Entsprechend der in Tabelle XIV zusammengestellten Reaktionsergebnisse wurde eine 0,25%ige Sojaproteinlösung für die Sensibilisierung der formalinisierten Hammelerythrozyten als am besten geeignet gefunden.

Mit der für die Sensibilisierung formalisierter Hammelerythrozyten ermittelten Konzentration einer 0,25%igen Sojaproteinlösung wurden die formalinisierten Hammelerythrozyten sensibilisiert und 2000 ml so sensibilisierter, formalisierter Hammelerythrozyten in 5 ml Ampullen abgefüllt, tief gefroren bei -35°C und anschließend in der Tiefkühltruhe bei -18°C aufbewahrt.

Die Aktivität der formalinisierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten wurde zwischenzeitlich über 6 Monate im Abstand von 8 Tagen geprüft, wobei bis zu diesem Zeitpunkt kein Aktivitätsverlust festgestellt werden konnte.

In weiteren Untersuchungen wurde geprüft, inwieweit mittels formalisierter, sensibilisierter Hammelerythrozyten in der indirekten Hämagglutination der quantitative Nachweis von Sojaprotein in Fleischerzeugnissen geführt werden kann.

III. Durchführung der indirekten Hämagglutination mit formalinisierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten zur quantitativen Bestimmung von Sojaprotein.

1. Extraktgewinnung

Für die Untersuchungen wurden Modellwürste nach folgender Rezeptur hergestellt:

40% Rindfleisch

35% Speck

25% Eis

2% Nitritpökelsalz pro kg Fleisch und Speck, 0,4% Gewürz pro kg Brät, 1% Na-Ascorbat pro kg Brät. Zu dieser Grundlage wurde

Sojaprotein in Konzentrationen von 0,1 - 3 % pro kg Fleisch und Speck zugegeben. 1/3 des Brätes blieb unerhitzt, 1/3 wurde 30 min auf 70° C Kerntemperatur und 1/3 30 min auf eine Kerntemperatur von 115° C erhitzt. Das Material wurde lyophilisiert. Für die Extraktion wurden 2 g Lyophilisat verwendet und mit der fünffachen Menge Veronalpuffer (8,2 ph) versetzt, im Ultra- Turrax 30 sec bei 20000 U /min homogenisiert. Die homogenisierte Probe wurde 2 Std. bei 37° C im Brutschrank extrahiert, mindestens 10 min bei 2000 U / min abzentrifugiert und der Extrakt mit einer Rekordspritze aufgezogen.

2. Bestimmung des Gesamteiweißgehaltes der Modellchargen nach Kjeldahl sowie des Gesamteiweißgehaltes der Extraktionslösungen mittels der Biuretreaktion.

Der Gesamteiweißgehalt der einzelnen Modellchargen wurde nach Kjeldahl bestimmt. Die ermittelten Eiweißkonzentrationen sind in Tabelle XVI aufgezeichnet. Die mittels der Biuretreaktion ermittelten Gesamteiweißgehalte der Extraktionslösungen sind in Tabelle XV zusammengestellt. Die Biuretreaktion wurde in Anlehnung an die von BEISENHERZ und Mitarbeiter (2) beschriebene Methode durchgeführt. Die die photometrische Messung stark beeinflussende Trübung der Extraktionslösungen aus dem Untersuchungsmaterial sollte durch Zugabe von KCN eliminiert werden.

3. Voradsorption des Antigens mit dem Antiserum

0,5 ml Antiserum werden mit 0,25 ml der entsprechenden Extraktlösungen versetzt und 2 Stunden bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird das Reaktionsgemisch zentrifugiert und der Überstand im Test weiter verwendet.

Tabelle XV

Gesamtproteinbestimmung der Modellchargen mittels der Biuretreaktion in mg % Protein

Sojaprotein-konzentrationen Kontrolle	Rohmaterial	70° C (Kerntemperatur)	115° C (Kerntemperatur)
0,1	0,2050	0,3719	0
0,2	0,2625	0,2625	0,0875
0,3	0,350	0,2844	0,0875
0,4	0,4375	0,3133	0,7437
0,5	0,6125	0,4375	0,275
0,6	0,7	0,525	0,3062
0,7	0,875	0,7	0,9625
0,8	1,05	0,9625	0,350
0,9	1,4	0,5906	0,9845
1,0	1,4875	0,5496	1,2250
1,1	1,6	0,5156	0,2625
1,2	1,6625	0,3256	1,4
1,3	1,75	0,35	0,7438
1,4	1,925	0,4156	0,9625
1,5	2,0125	0,5031	0,3281
1,6	2,1875	0,6215	0,5469
1,7	2,3625	0,3281	0,3061
1,8	2,45	0,4375	0,5250
1,9	2,975	0,5390	0,35
2,0	3,045	0,3063	0,9438
2,1	3,5	0,4624	0,9625
2,2	3,5875	0,4812	0,5275
2,5	3,7625	0,5390	0,3063
2,7	3,9737	0,5688	0,5238
3,0	4,025	0,4375	0,3283
			0,4594

TABELLE XVI

Gesamteiweißbestimmung der Modellchargen nach Kjeldahl in mg % Protein

Sojaproteinkonzentrationen	Rohmaterial	70° C (Kerntemperatur)	115° C (Kerntemperatur)
Kontrolle			
0,1	18,5	21	17,5
0,2	35,9	20,1	18,4
0,3	35	22,8	13,1
0,4	34,1	24,5	11,7
0,5	35,5	21,9	15,8
0,6	38,5	19,3	16,6
0,7	20,1	13,1	8,4
0,8	24,5	11,5	18,4
0,9	17,5	15,8	12,3
1,0	22,8	18,4	7,9
1,1	37,5	25,8	21,0
1,2	36,8	25,4	14,9
1,3	34,1	14,5	15,5
1,4	28,9	16,6	14,0
1,5	21,0	26,3	26,2
1,6	22,7	28,0	25,4
1,7	13,1	22,8	26,2
1,8	16,6	15,7	10,2
1,9	15,7	23,6	19,2
2,0	18,4	22,8	27,1
2,1	17,5	13,1	23,6
2,2	15,0	16,4	21,9
2,3	11,4	14,0	26,1
2,4	19,3	16,6	12,0
2,5	16,0	12,3	10,5
2,6	23,0	14,5	7,9

Ergebnisse

Beim Vergleich des mittels der Biuretreaktion ermittelten Gesamteiweißgehaltes der Extrakte bestand zwischen dem Zusatz an Sojaprotein und dem Gesamteiweißgehalt bei nicht erhitztem Material eine eindeutige Korrelation. Bei den Extrakten, die von dem auf 70° C bzw. 115° C erhitzten Untersuchungsmaterial hergestellt worden waren, bestand keine Korrelation zwischen der Menge des Sojaproteingehaltes zum Gesamteiweißgehalt. Wie aus der Tabelle XV ersichtlich wird, kam es hier zu erheblichen Schwankungen.

Ergebnisse

Beim Vergleich der mittels der Stickstoff-Bestimmung nach Kjeldahl ermittelten Gesamteiweißgehalte der Extrakte bestand keine Korrelation zwischen der Menge des Sojaproteingehaltes zum Gesamteiweißgehalt. Auch hier kam es zu erheblichen Schwankungen.

- 4) Durchführung der indirekten Hämagglutination zum Nachweis von Sojaprotein mit formalinisierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten.

In der 1. Reaktionsreihe wurde durch die quadratische Verdünnung des Antiserums und bei konstanter Zugabe der mit Sojaprotein formalinisierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten der Antiserumtiter gegen Sojaprotein bestimmt (positive Agglutination).

In der 2. Reihe wurde 0,5 ml des mit einer 2,5 %igen Sojaproteinlösung voradsorbierten Antiserums quadratisch ausverdünnt und mit einer konstanten Lösung der formalinisierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten versetzt (negative Kontrolle).

In der 3. Reihe wurden 0,5 ml des mit Extraktionslösung aus einem sicher nicht Fremdeiweiß enthaltenden Untersuchungsmaterial versetzten, voradsorbierten Antiserum quadratisch ausverdünnt und ebenfalls mit einer konstanten Lösung formalinisierten, sensibilisierter Hammelerythrozyten versetzt (positive Kontrolle).

In den folgenden Reaktionsansätzen wurden die untersuchten fremdeiweißhaltigen Extraktionslösungen des Untersuchungsmaterials nach erfolgter Voradsorption mit dem Antiserum in Mengen von 0,5 ml austitriert und ihre Reaktion mit der konstanten Menge formalinisierten, sensibilisierter Hammelerythrozyten unter Verwendung verschiedener Antiseren gegen Sojaprotein geprüft.

TABELLE XVII

Quantitative Bestimmung von Sojaprotein in nicht erhitztem Untersuchungsmaterial mit einem Antiserumtitrer von 65456

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456
pos. Serum- kontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
neg. Serum- kontrolle	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
SJ-Konzen- trationen																
K	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0,3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0,4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0,6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0,7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0,8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
1,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
1,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
1,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
1,3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
1,4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
1,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
1,6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
1,7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
1,8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
1,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
2,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
2,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
2,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
2,3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
2,4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+

Quantitative Bestimmung von Sojaprotein in nicht erhitztem Untersuchungsmaterial mit einem Antiserumfilter von 32728

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768
pos. Serum- kontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
neg. Serum- kontrolle	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Sj- Kon- zentrationen	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
K	0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
0,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
0,3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
0,4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
0,6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
0,7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
0,8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1,3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1,4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1,6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1,7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1,8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
2,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
2,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
2,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
2,5	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3,0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELLE XIX

Quantitative Bestimmung von Sojaprotein in nicht erhitztem Untersuchungsmaterial mit einem Antiserumtitrer von 16364

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728
pos.Serum- kontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
neg.Serum- kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sj-Konzen- trationen	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
K	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0,3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
0,4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
0,6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
0,7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
0,8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
1,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
1,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
1,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
1,3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
1,4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
1,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
1,6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
1,7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
1,8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
1,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
2,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
2,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
2,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
2,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
2,7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	
3,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	

Quantitative Bestimmung in bis auf 70°C (Kerntemperatur) erhitztem Untersuchungsmaterial mit einem Antiserumtiter von 65456

[illegible]

TABELLE XXI

Quantitative Bestimmung in bis auf 70° C (Kerntemperatur) erhitztem Untersuchungsmaterial mit einem Antiserumtiter von 16364

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364
pos. Serum- kontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
neg. Serum- kontrolle	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Sj- Konzen- trationen	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
K	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0,3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0,4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0,6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0,7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0,8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
1,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
1,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
1,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
1,3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
1,4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
1,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
1,6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
1,7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
1,8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
1,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
2,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
2,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
2,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
2,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
2,7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
3,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+

pos. Serum- kontrolle	neg. Serum- kontrolle	Sj- Konzen- trationen	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0,1	0,2	0,3	0											

TABELLE XXIV

Quantitative Bestimmung in bis auf 115° C (Kerntemperatur) erhitztem Untersuchungsmaterial mit einem Antiserumtitrer von 1024

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
pos. Serumkontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+
neg. Serumkontrolle	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Sj-Konzentrationen										
K	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+		
0,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+		
0,3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+		
0,4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+			
0,6	+++	+++	+++	+++	+++	+	+			
0,7	+++	+++	+++	+++	+++	+	+			
0,8	+++	+++	+++	+++	+++	+	+			
0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+	+			
1,0	+++	+++	+++	+++	+					
1,1	+++	+++	+++	+++	+					
1,2	+++	+++	+++	++	+					
1,3	+++	+++	++	+	+					
1,4	+++	+++	++	+	+					
1,5	+++	+++	++	+	+					
1,6	+++	+++	++	+	+					
1,7	+++	+++	++	+	+					
1,8	+++	+++	++	+	+					
1,9	+++	+++	++	+	+					
2,0	+++	+++	++	+	+					
2,1	+++	+++	++	+	+					
2,2	++	++	++	+	+					
2,5	++	++	++	+	+					
2,7	++	+	+							
3,0	+									

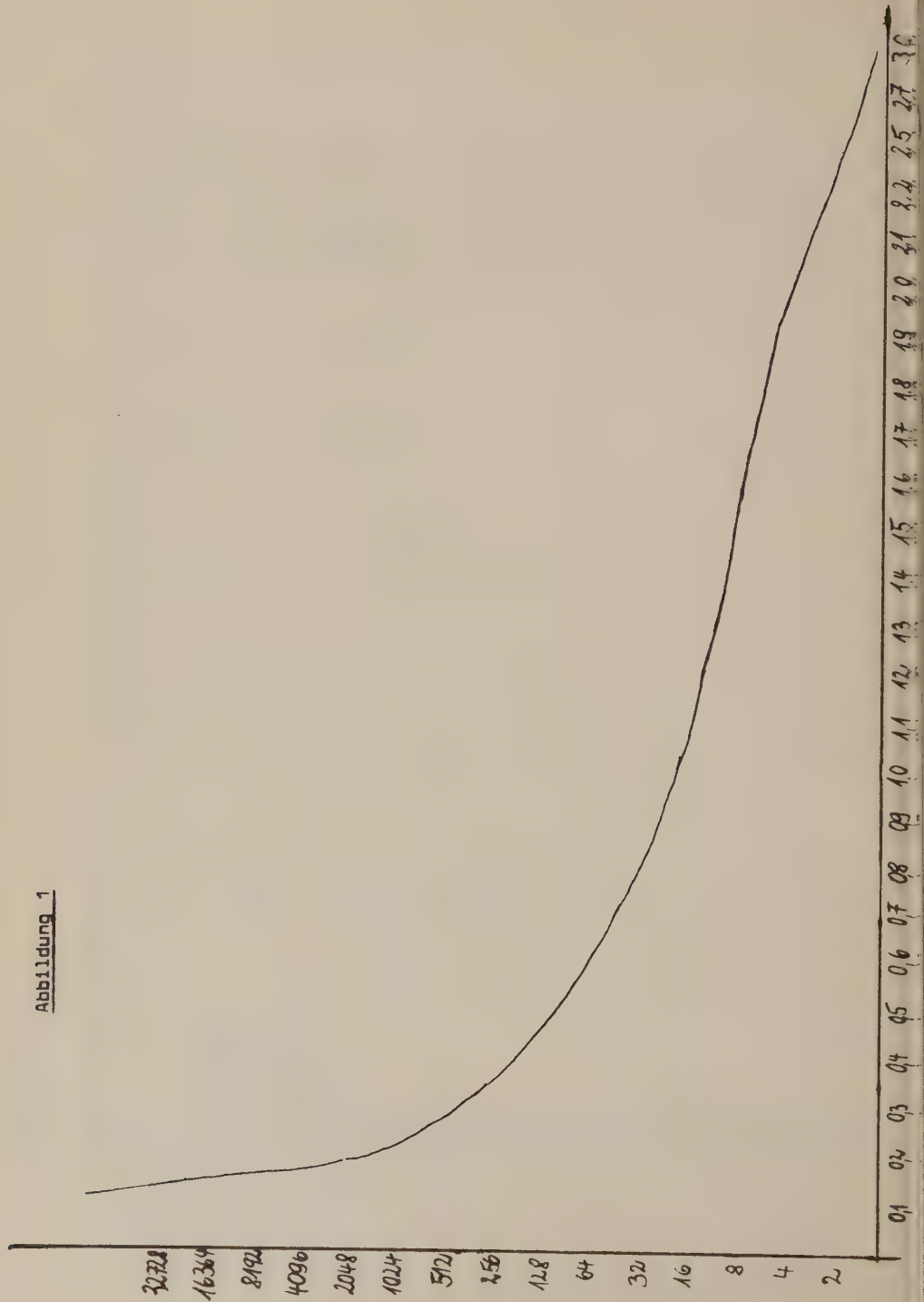
TABELLE XXV

Quantitative Bestimmung in bis auf 115° C (Kerntemperatur) erhitztem Untersuchungsmaterial mit einem Antiserumtiter von 8192

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192
pos. Serum- kontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
neg. Serum- kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sj-Konzentratio- nen	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
K	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
0,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
0,3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
0,4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
0,6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
0,7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
0,8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1,3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1,4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1,6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1,7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1,8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
1,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
2,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
2,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
2,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
2,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
2,7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
3,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+

In Abbildung 1 und 2 sind die Eichkurven für die quantitative Bestimmung von Sojaprotein in 30 min bis auf 70° C bzw. 115° C (Kerntemperatur) erhitzten Fleischerzeugnissen dargestellt. Die Eichkurven wurden aus den Mittelwerten von jeweils 50 Untersuchungsreihen erstellt.

Abbildung 1



IV Mikrotitermethode

Bei der Anwendung des Mikrotitersystems⁺ benutzt man Plexi-
glasplatten mit kleinen Vertiefungen anstatt der herkömmlichen
Reagenzgläser. Vorgelegt werden hier 0,025 ml physiologische
Kochsalzlösung und 0,025 ml Antiserum, das mit kalibrierten
Mikroverdünnern quadratisch verdünnt wird. Mit ebenfalls
kalibrierten Pipettentropfern werden 0,025 ml sensibilisierte
Erythrozyten eingetropft.

Die Beurteilung der Ergebnisse erfolgt wie bei der Reaktion der
klassischen indirekten Hämagglutination.

Die Untersuchungsergebnisse sind in den Tabellen XXVI - XXXI
zusammengefaßt.

⁺
Fa. Cooke Instruments AG

Abbildung 2

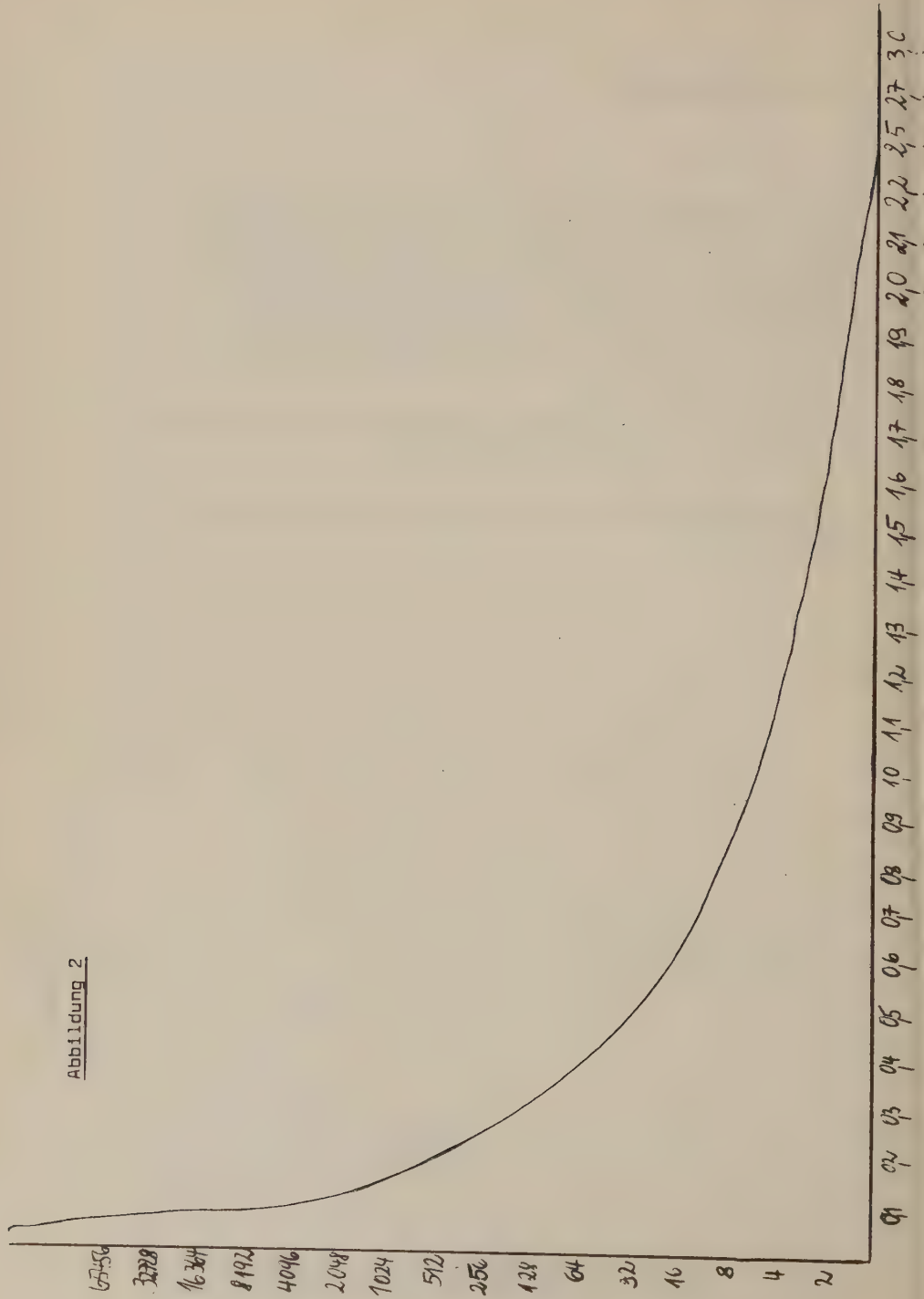


Tabelle XXVI

Quantitative Bestimmung von Sojaprotein in Rohmaterial
mittels der Mikrotitermethode

	2	4	8	16	32	64	128	256	512
pos. Serum- kontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
neg. Serum- kontrolle	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Sj. 0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Sj. 0,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+
Sj. 0,3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	
Sj. 0,4	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	
Sj. 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	
Sj. 0,6	+++	+++	+++	+++	+++	++	+		
Sj. 0,7	+++	+++	+++	+++	+++	++	+		
Sj. 0,8	+++	+++	+++	+++	++	+			
Sj. 0,9	+++	+++	+++	+++	++	+			
Sj. 1,0	+++	+++	+++	+++	++	+			
Sj. 1,1	+++	+++	+++	+++	++	+			
Sj. 1,2	+++	+++	+++	++	++	+			
Sj. 1,3	+++	+++	+++	++	+				
Sj. 1,4	+++	+++	+++	++	+				
Sj. 1,5	+++	+++	+++	++	+				
Sj. 1,6	+++	+++	++	++	+				
Sj. 1,7	+++	+++	++	+					
Sj. 1,8	+++	+++	++	+					
Sj. 1,9	+++	+++	++	+					
Sj. 2,0	+++	++	+						
Sj. 2,1	+++	++	+						
Sj. 2,2	+++	++	+						
Sj. 2,5	++	++	+						
Sj. 2,7	++	+							
Sj. 3,0	++	+							

Tabelle XXVII

Quantitative Bestimmung von Sojaprotein in
Rohmaterial mittels der Mikrotitermethode

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
pos. Serum- kontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
neg. Serum- kontrolle	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Sj. 0,1	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+		
Sj. 0,2	+++	+++	+++	+++	+++	++	+			
Sj. 0,3	+++	+++	+++	+++	+++	++	+			
Sj. 0,4	+++	+++	+++	+++	+++	++	+			
Sj. 0,5	+++	+++	+++	+++	++	++	+			
Sj. 0,6	+++	+++	+++	+++	++	+				
Sj. 0,7	+++	+++	+++	+++	++	+				
Sj. 0,8	+++	+++	+++	+++	++	+				
Sj. 0,9	+++	+++	+++	++	+					
Sj. 1,0	++++	+++	+++	++	+					
Sj. 1,1	+++	+++	+++	++	+					
Sj. 1,2	+++	+++	+++	++	+					
Sj. 1,3	+++	+++	+++	++	+					
Sj. 1,4	+++	+++	++	+						
Sj. 1,5	+++	+++	++	+						
Sj. 1,6	+++	+++	++	+						
Sj. 1,7	+++	+++	++	+						
Sj. 1,8	+++	+++	++	+						
Sj. 1,9	+++	++	++	+						
Sj. 2,0	+++	++	+	+						
Sj. 2,1	+++	++	+							
Sj. 2,2	+++	++	+							
Sj. 2,5	++	++	+							
Sj. 2,7	++	+								
Sj. 3,0	+	+								

TABELLE XXVIII

Quantitative Bestimmung von Sojaprotein mittels
der Mikrotitermethode in bis auf 70° C erhitztem

Material

	2	4	8	16	32	64	128	256	512
pos. Serum- kontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
neg. Serum- kontrolle	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Sj. 0,1	+++	+++	+++	+++	++	++	+		
Sj. 0,2	+++	+++	+++	+++	++	+			
Sj. 0,3	+++	+++	+++	+++	++	+			
Sj. 0,4	+++	+++	+++	+++	++	+			
Sj. 0,5	+++	+++	+++	+++	++	+			
Sj. 0,6	+++	+++	+++	++	++	+			
Sj. 0,7	+++	+++	+++	++	+				
Sj. 0,8	+++	+++	+++	++	+				
Sj. 0,9	+++	+++	+++	++	+				
Sj. 1,0	+++	+++	+++	++	+				
Sj. 1,1	+++	+++	+++	++	+				
Sj. 1,2	+++	+++	++	+					
Sj. 1,3	+++	+++	++	+					
Sj. 1,4	+++	+++	++	+					
Sj. 1,5	+++	+++	++	+					
Sj. 1,6	+++	+++	++	+					
Sj. 1,7	+++	+++	++	+					
Sj. 1,8	+++	++	+						
Sj. 1,9	+++	++	+						
Sj. 2,0	+++	++	+						
Sj. 2,1	+++	++	+						
Sj. 2,2	++	++	+						
Sj. 2,5	++	+							
Sj. 2,7	++	+							
Sj. 3,0	++								

Tabelle XXIX

Quantitative Bestimmung von Sojaprotein mittels
der Mikrotitermethode in bis auf 70° erhitztem

Material

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
pos. Serum- kontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
neg. Serum- kontrolle	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Sj. 0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+		
Sj. 0,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+		
Sj. 0,3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+		
Sj. 0,4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+			
Sj. 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+			
Sj. 0,6	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+			
Sj. 0,7	+++	+++	+++	+++	+++	++	+				
Sj. 0,8	+++	+++	+++	+++	++	++	+				
Sj. 0,9	+++	+++	+++	+++	++	++	+				
Sj. 1,0	+++	+++	+++	+++	++	+					
Sj. 1,1	+++	+++	+++	+++	++	+					
Sj. 1,2	+++	+++	+++	+++	++	+					
Sj. 1,3	+++	+++	+++	+++	++	+					
Sj. 1,4	+++	+++	+++	+++	++	+					
Sj. 1,5	+++	+++	+++	++	++	+					
Sj. 1,6	+++	+++	+++	++	+						
Sj. 1,7	+++	+++	+++	++	+						
Sj. 1,8	+++	+++	+++	++	+						
Sj. 1,9	+++	+++	+++	++	+						
Sj. 2,0	+++	+++	+++	++	+						
Sj. 2,1	+++	+++	++	+							
Sj. 2,2	+++	+++	++	+							
Sj. 2,5	+++	+++	++	+							
Sj. 2,7	+++	+++	++	+							
Sj. 3,0	+++	++	++	+							

Material

[illegible]

Tabelle XXXI

Quantitative Bestimmung von Sojaprotein mittels
der Mikrotitermethode in bis auf 115° C erhitztem

	<u>Material</u>								
	2	4	8	16	32	64	128	256	512
pös. Serum- kontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+
neg. Serum- kontrolle	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Sj. 0,1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	
Sj. 0,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	
Sj. 0,3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	
Sj. 0,4	+++	+++	+++	+++	+++	++	+		
Sj. 0,5	+++	+++	+++	+++	+++	++	+		
Sj. 0,6	+++	+++	+++	+++	+++	++	+		
Sj. 0,7	+++	+++	+++	+++	+++	++	+		
Sj. 0,8	+++	+++	+++	+++	++	+			
Sj. 0,9	+++	+++	+++	+++	++	+			
Sj. 1,0	+++	+++	+++	++	+				
Sj. 1,1	+++	+++	+++	++	+				
Sj. 1,2	+++	+++	+++	++	+				
Sj. 1,3	+++	+++	+++	++	+				
Sj. 1,4	+++	+++	++	++	+				
Sj. 1,5	+++	+++	++	+					
Sj. 1,6	+++	+++	++	+					
Sj. 1,7	+++	+++	++	+					
Sj. 1,8	+++	++	++	+					
Sj. 1,9	+++	++	++	+					
Sj. 2,0	+++	++	+						
Sj. 2,1	+++	++	+						
Sj. 2,2	+++	++	+						
Sj. 2,5	++	++	+						
Sj. 2,7	++	+	+						
Sj. 3,0	+	+	+						

Ergebnisse

Bei der Anwendung der Mikrotitermethode wurde grundsätzlich ein geringerer Antiserumtiter als bei der indirekten Hämagglutination festgestellt. Je geringer der Antiserumtiter ist, desto geringer ist auch die Differenzierung zwischen den einzelnen Sojaproteinkonzentrationen.

Hier konnte bei Rohmaterial nur eindeutig zwischen den Sojaproteinkonzentrationen 0,1; 0,8; 1,3; 1,9; 2,5; 2,7 und 3 % differenziert werden.

Bei dem auf 70° C erhitzten Material konnte zwischen den Konzentrationen 0,1; 0,6 ; 1,1; 1,7; 2,2; 2,7 und 3 % unterschieden werden.

Bei dem auf 115° C erhitzten Material war eindeutig Sojaprotein in Konzentrationen ab 0,2 zu erfassen. Quantitativ konnte zwischen den Konzentrationen 0,2; 0,7; 1,4 ; 2 ; 2,2; 2,5 und 3 % differenziert werden. Auch hier wird deutlich, daß die Zuverlässigkeit der Aussage von der Höhe des Antiserumtiters abhängig ist.

Versuche zur Reproduzierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse

Sechs Proben mit unbekanntem Fremdeiweißzusatz und unterschiedlicher Erhitzungstemperatur wurden auf ihren Gehalt an Sojaprotein untersucht und die Ergebnisse mit den vorläufigen Reaktionsergebnissen dieser Arbeit verglichen. Für die Untersuchung wurden die Proben lyophilisiert und nach dem angegebenen Extraktionsverfahren extrahiert.

Die Ergebnisse wurden mittels der aus den vorliegenden erstellten Ergebnissen der Eichkurven abgelesen und folgende Konzentrationen ermittelt:

Chargenbezeichnung	ermittelter Sojaprotein- zusatz in %	tatsächlicher Sojaproteinzusatz in %
A	1,0	1,0
B	-	-
C	0,5	0,5
D	1,0	1,0
E	2,5	2,5
F	-	-

Bei der Probe C handelt es sich um ein bis auf 110° C erhitztes Fleischerzeugnis. Die Proben A und B wurden 30 min auf 115° C (Kerntemperatur) erhitzt und die Probe D und E 30 min auf 120° C (Kerntemperatur). Die Probe B war frei von jeglichem Fremdeiweißzusatz, während bei der Probe F Trockenblutplasma in der Konzentration von 1,5 % zugesetzt worden war.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, daß auch bei dem, dem Untersucher unbekanntem Material, das zugesetzte Sojaprotein spezifisch quantitativ ermittelt werden kann.

D. D I S K U S S I O N

Die mit Cialit oder Merthiolat konservierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten zeigten bereits nach fünf Tagen einen Aktivitätsverlust. Nach 15 Tagen war der Aktivitätsverlust so hoch, daß sich eine weitere Untersuchung erübrigte, da außerdem die Spezifität und Empfindlichkeit der sensibilisierten Hammelerythrozyten zusätzlich durch Hämolyse beeinflußt worden war. Auch unterschiedliche Cialitkonzentrationen von 0,01 - 0,1 % führten nicht zur Verbesserung der konservierenden Wirkung. In eigenen Untersuchungen konnten somit die Angaben von KOTTER und HERRMANN (42), daß sich sensibilisierte Hammelerythrozyten, mit Cialit 1 : 10 000 versetzt, ohne Beeinträchtigung der Reaktion über 10 Wochen aufbewahren lassen, nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse der Konservierung konnten dann etwas verbessert werden, wenn vor Gebrauch der sensibilisierten Erythrozyten die Konservierungslösung abzentrifugiert und die Hammelerythrozyten in physiol. Kochsalzlösung aufgeschwemmt zur Reaktion gebracht wurden. Trotzdem war auch bei dieser Behandlung der sensibilisierten Hammelerythrozyten der Aktivitätsverlust so hoch, daß eine entscheidende Verlängerung der Haltbarkeit nicht erreicht werden konnte. Wahrscheinlich ist die sehr frühe Reaktionsbeeinträchtigung, ähnlich wie bei den mit Nipagin sensibilisierten, konservierten Erythrozyten nach KOTTER und HERRMANN (42) auf Konzentrationsverschiebungen im Sensibilisierungsgemisch zurückzuführen. Auch das Auffangen der Hammelerythrozyten unter sterilen Bedingungen führte nicht zur Verbesserung der Reaktionsergebnisse. Die mit Baycovin versetzten sensibilisierten Hammelerythrozyten reagierten über 15 Tage ohne Aktivitätsverlust. Erst nach 21 Tagen wurde eine deutliche Reaktionsabschwächung und zunehmende Hämolyse beobachtet. Bei der Aufschwemmung der sensibilisierten Hammelerythrozyten in Blutkonservenflaschen war erst nach 3 Wochen nach dem Ansatz ein Aktivitätsverlust zu beobachten, der jedoch dann unter zunehmender Hämolyse immer stärker wurde. Beim Vergleich der Ergebnisse zeigt sich deutlich, daß, ohne deutliche Beeinträchtigung der Reaktion, bei Verwendung der handelsüblichen Konservierungsmittel, sensibilisierte Hammelerythrozyten bestenfalls 14 Tage konserviert werden können.

Die Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen bestand jedoch darin, die indirekte Hämagglutination so zu modifizieren, daß sie breite Anwendung im Routinebetrieb finden kann. Dafür war es notwendig, die Hauptfehlerquelle dieser Reaktion, die Sensibilisierung der Hammelerythrozyten mit Fremdeiweiß, nicht nur zu standardisieren, sondern sensibilisierte Hammelerythrozyten über eine längere Zeit, ohne Empfindlichkeit und Spezifität der Reaktion zu beeinträchtigen, zu konservieren. Da durch die Aufbewahrung der sensibilisierten Hammelerythrozyten in Blutflaschen erreichte Konservierung über drei Wochen nicht befriedigen konnte, wurde versucht, durch Formalinbehandlung der sensibilisierten Erythrozyten nach HERRMANN und MERKLE (37) ihre Haltbarkeit über einen längeren Zeitraum zu erreichen und gleichzeitig zu prüfen, inwieweit derartig behandelte Hammelerythrozyten für den quantitativen Nachweis von Sojaprotein in hocherhitzten Fleisch-erzeugnissen geeignet sind.

Für eine optimale Reaktion der "passiven" Agglutination ist die Konzentration des Antigens im Sensibilisierungsgemisch von Bedeutung. Nach LANDY (45) können die "Rezeptoren" der Erythrozyten nur eine begrenzte Menge Antigen aufnehmen und nur ein bestimmter Teil der Erythrozytenoberfläche wird von einzelnen Antigenen abgesättigt. Es war deshalb notwendig, sowohl die geringste Antigenmenge, als auch die Menge zu ermitteln, die zur Erreichung einer optimalen Reaktion notwendig ist. Für die Sensibilisierung nativer Hammelerythrozyten mit Sojaprotein ermittelte HERRMANN und KOTTER (32) bei Verwendung von Promine D 32 mg, bei Verwendung von EDI PRO N 27 mg lösliche Substanz pro ml Erythrozyten. Bei der Sensibilisierung der mit Formalin behandelten Hammelerythrozyten wurde als geringste Menge für das Sojaprotein EDI PRO N die Konzentration von 0,02 % im Sensibilisierungsgemisch ermittelt. Mit einer Konzentration von 0,25 % Sojaprotein im Sensibilisierungsgemisch erreichte die Reaktion ihr Optimum. Da die optimale Sensibilisierungstemperatur bei 37 °C liegt, und die ausreichende Absättigung der Sensibilisierungsgemische bereits nach 100 min erfolgt ist, wurden die Sensibilisierungsgemische über 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Die mit Formalin behandelten und anschließend zur Sensibilisierung benutzten Hammelerythrozyten sind zwischenzeitlich über 6 Monate ohne Aktivitätsverlust haltbar und eignen sich auch für einen quantitativen Nachweis von Sojaprotein in Fleischerzeugnissen. Die Anti-

serumgewinnung erfolgt nach Angaben von HERRMANN (33), wobei die Verwendung schwerer Tiere zur Immunisierung von Vorteil war. Mit dem nach dem "Hitze-Alkali-Präzipitin" hergestellten Antigen wurden Antiseren gewonnen, mit denen sowohl im nativem, als auch in bis auf 120 °C erhitztem Material Fremdeiweißzusätze erfaßt werden konnten. Die von HERRMANN (33) gemachten Angaben, daß mittels der Immunisierung mit dem "Hitze-Alkali-Präzipitin" Immunsere erhalten werden, die den Nachweis von Fremdeiweiß sowohl in nativem, als auch hocherhitztem Material ermöglichen, konnten somit bestätigt werden.

Eine höhere Erhitzung des Antigens zur Immunisierung für den Nachweis von Sojaprotein in hocherhitztem Material, das 30 min auf eine Kerntemperatur von 120 °C erhitzt worden ist, wie von DEGENKOLB und HINGERLE (12/13) angegeben, ist nach den vorliegenden Ergebnissen, nicht notwendig.

Die Untersuchungsergebnisse des quantitativen Nachweises von Sojaprotein unterstreichen die von KOTTER und HERRMANN (33), für den quantitativen Nachweis von Fremdeiweißen in Fleischerzeugnissen aufgezeigten Bedingungen, daß für den quantitativen Nachweis mindestens ein Antiserumtiter von 16000 und höher verwendet werden muß. Die von KRÜGER und GROBKLAUS (44) angesprochene Nichtberücksichtigung der thermischen Reaktionsbreite des Antiserums bei der indirekten Hämagglutination, wobei die an Erythrozyten gekoppelten nativen Antigene gegen die verbleibende Antikörpermenge austitriert werden, trifft für Antikörper, die durch Immunisierung mittels des "Hitze-Alkali-Präzipitins" hergestellt wurden, nicht zu.

Im Gegensatz zur Präzipitationsreaktion, deren Empfindlichkeit durch die noch sichtbare Menge an Antigen-Antikörper Komplex limitiert ist, liegt die Empfindlichkeitsgrenze der Agglutination dann wesentlich höher, wenn man Erythrozyten mit Antigenen belädt.

Die Grenze der Empfindlichkeit der Hämagglutination liegt bei 0,1-0,2 µg Eiweißstickstoff gegenüber 3-10 µg bei der Präzipitation.

Das Prinzip der indirekten Hämagglutination zum Nachweis von Sojaprotein im Untersuchungsmaterial besteht darin, daß die mit Sojaprotein sensibilisierten Erythrozyten in abgestuften Mengen des zugehörigen Antiserums vom Kaninchen verbraucht werden. Die größte Serumverdünnung, die noch deutliche Agglutination zeigt, wird als Endstufe oder Titer bezeichnet. Versetzt man das Antiserum, bevor man es mit den sensibilisierten Hammelerythrozyten zusammenbringt, mit Extraktionslösungen aus dem Untersuchungsmaterial, so ist bei dem mit sojaproteinreichem Material voradsorbierten Antiserum eine Abschwächung des ursprünglichen Titers festzustellen. In Abhängigkeit vom Sojaprotein Gehalt kommt es bei der indirekten Hämagglutination zur Hemmung des Agglutinationstiters gegenüber dem Antiserumtiter, da aufgrund der vorausgehenden Präzipitation der Antikörpergehalt bei Anwesenheit des homologen Antigens verringert worden ist. Für die quantitative Auswertung der Untersuchungen müssen die Modellchargen möglichst den gewerbeüblichen Hauptkriterien (Ausgangsmaterial, Gewürz, Kutterhilfsmittel, Praktiken der Fremdeiweißzugabe, Erhitzung usw.) angepaßt sein.

Die bei reinen Antigenlösungen beobachtete lineare Beziehung zwischen Antigenkonzentration und Titerabschwächung ist bei Extrakten aus Probenmaterial nur bei Rohmaterial zutreffend (34).

Bei erhitztem Material kommt es zu Abweichungen aufgrund der vorangegangenen Erhitzung, so daß Titerwerte, die aus reinen Antigenverdünnungen ermittelt wurden, nicht als Vergleich gelten können (34).

In eigenen Untersuchungen wurde zur Erstellung der Eichkurven für jeden Antiserumtiter und Antigengehalt 60 Kontrolluntersuchungen angesetzt und somit erreicht, daß mit zunehmendem Stichprobenumfang die Korrelation der x-y-Werte sichtbar wird.

Sojaprotein konnte in nicht erhitztem Material sowie in Material, welches 30 min auf 70 °C (Kerntemperatur) erhitzt worden war, in Konzentrationen ab 0,1 % erfaßt werden. Im Material, daß 30 min auf 115 °C (Kerntemperatur) erhitzt worden war, konnte Sojaprotein erst in Konzentrationen ab 0,2 % mit absoluter Sicherheit erfaßt werden.

Für die grob quantitative Erfassung des Sojaproteinzusatzes im Untersuchungsmaterial ist mindestens ein Antiserumtiter von 8000 notwendig. Während für eine quantitative Differenzierung bis auf 1/10 Vol. % der Antiserumtiter um ein Vielfaches höher, mindestens

aber bei 32000 liegen muß.

Die von KRÜGER und GROßKLAUS (44) ausgesprochene Nichteignung der indirekten Hämagglutination zum quantitativen Nachweis von Fremdeiweiß generell, wird durch die vorliegenden Untersuchungsergebnisse widerlegt, so daß für den Nachweis gelöster Antigene deshalb nicht "nur die Präzipitation als Reaktionstyp in Frage kommen kann".

DEGENKOLB und HINGERLE (12/13) wiesen darauf hin, daß die große Empfindlichkeit der Reaktion nicht über die Schwierigkeiten bei der Ablesegenauigkeit hinweg täuschen dürfte und immer noch ein gewisser Spielraum gegeben sei, die Konzentrationsunterschiede auf eine Verdünnungsstufe zu lokalisieren. Deshalb könne mit der indirekten Hämagglutination nur angenähert Rückschlüsse auf die verarbeitete Antigenmenge gezogen werden.

Bei der Prüfung der durch eigene Untersuchungen erstellten Eichkurven für den quantitativen Nachweis von Sojaprotein auf ihre Reproduzierbarkeit, Zuverlässigkeit sowie Spezifität mit sechs Proben, bei denen Menge und Art des Fremdeiweißzusatzes sowie Erhitzungsgrad des Erzeugnisses unbekannt waren, konnte selbst bei in bis auf 120 °C erhitztem Material der tatsächliche Sojaproteinzusatz sicher ermittelt werden.

Im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen von KRÜGER und GROßKLAUS (44) zum quantitativen Nachweis von Sojaprotein mit Hilfe der "quantitativen Präzipitatemessung" nach DEGENKOLB und HINGERLE (12/13) beschränkt sich die Bewertung der quantitativen Aussage mittels der indirekten Hämagglutination nicht nur auf die Untersuchungen der Modellchargen.

Selbst beim Nachweis von Sojaprotein in bis auf 120 °C erhitzten Fleischerzeugnissen "versagte" entgegen den Angaben von KRÜGER und GROßKLAUS (44) die indirekte Hämagglutination nicht.

Wie bereits HERRMANN und MERKLE (37) über den Nachweis von aufgeschlossenen Milcheiweiß unter Verwendung formalinisierter, sensibilisierter Hammelerythrozyten berichtet haben, konnte die indirekte Hämagglutination auch für den quantitativen Nachweis von Sojaprotein so vereinfacht werden, daß eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Reaktionsergebnisse sowie eine erhebliche Arbeitsvereinfachung erreicht werden konnte. Die "Anfälligkeit" der Reaktion (44), verbunden mit dem großen Arbeitsaufwand konnte durch Verwendung formalinisierter, sensibilisierter Hammelerythrozyten ausgeschal-

tet werden.

Da sich die Eignung einer Methode für ihren Einsatz als Routineuntersuchung auch nach dem für ihre Durchführung notwendigen Zeit- und Materialaufwand richtet, konnte durch Verwendung der über 6 Monate und länger haltbaren formalinisierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten der Arbeitsaufwand für die Durchführung der indirekten Hämagglutination auf den für eine Präzipitation beschränkt werden. Für die Durchführung einer Reaktion werden vom Ansatz bis zu ihrer Beurteilung 4 Stunden benötigt, wobei mit eingeschlossen ist, daß die Reaktion 2 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert.

Eine große Rolle für die Wirtschaftlichkeit der Reaktion spielt der Antiserumverbrauch. Da der Serumverbrauch für die Durchführung der indirekten Hämagglutination sehr hoch ist (2,5 ml), wurde versucht, durch Anwendung der Mikrotitermethode den Antiserumverbrauch herabzusetzen.

Nach den bisherigen Untersuchungen eignet sich die Mikrotitermethode nur für eine grob quantitative Differenzierung der Sojaproteinzusätze sowohl bei nativem als auch hoch erhitztem Material. Qualitativ kann das Sojaprotein bei nativem als auch bei auf 70 °C (Kerntemperatur) erhitztem Material in Konzentrationen ab 0,1 % erfaßt werden, bei bis auf 115 °C (Kerntemperatur) in Konzentrationen ab 0,2 %. Der Antiserumbedarf kann für eine Untersuchung mit positiver und negativer Kontrolle auf 0,075 ml eingeschränkt werden.

Als Nachteil dieser Methode erwies sich jedoch ihre geringe Reaktionsaktivität gegenüber der klassischen Form der indirekten Hämagglutination, so daß für diese Reaktionsmethode wesentlich höhere Antiserumtiter für eine quantitative Aussage notwendig sind, als bei der "klassischen" indirekten Hämagglutination. Wie sich zwischenzeitlich durch Änderung der Sensibilisierungszeit für den Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß mit formalinisierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten herausgestellt hat, kann die Aktivität so behandelte formalinisierte, sensibilisierte Hammelerythrozyten um ein Vielfaches erhöht werden HERRMANN und MERKLE (37).

Es wäre deshalb noch zu prüfen, ob sich gleiche oder ähnliche Verbesserungen der Mikrotitermethode auch für den quantitativen Nachweis in erhitzten Fleischerzeugnissen erreichen lassen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Mit Sojaprotein sensibilisierte Hammelerythrozyten lassen sich ohne Aktivitätsverlust über 3 Wochen in Blutkollaschen konservieren.
2. Mit Formalin konservierte, sensibilisierte Hammelerythrozyten können über 6 Monate und länger ohne Verlust an Empfindlichkeit und Spezifität in der indirekten Hämagglutination verwendet werden.
3. Mit formalinisierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten kann Sojaprotein in nativem und in bis auf 70° C (Kerntemperatur) erhitztem Untersuchungsmaterial in Konzentrationen ab 0,1% , in bis auf 115° C (Kerntemperatur) erhitztem Untersuchungsmaterial in Konzentrationen ab 0,2% ermittelt werden.
4. Die Untersuchungsergebnisse konnten mit größt möglicher Sicherheit an dem dem Untersucher vorgelegtem handelsüblichen Fleischerzeugnis reproduziert werden.
5. Durch die Verwendung standardisierter, formalinisierten, sensibilisierter Hammelerythrozyten konnte Zeit- und Arbeitsaufwand für die Durchführung der indirekten Hämagglutination auf 3 Stunden herabgesetzt werden.
6. Durch Anwendung des Mikrotitersystems kann der Serumverbrauch von 2,5ml in der indirekten Hämagglutination auf 0,075ml eingeschränkt werden.
7. Mit Hilfe des Mikrotitersystems kann Sojaprotein in Konzentrationen ab 0,1% bei nativem und bis auf 70° C (Kerntemperatur), sowie bei bis auf 115° C (Kern-temperatur) erhitztem Untersuchungsmaterial erfaßt und die untersuchten Sojaproteinkonzentrationen grob quantitativ differenziert werden.

S U M M A R Y

1. Mutton erythrocytes that have been sensitized with soya protein can be preserved in Bluko bottles for more than three weeks without any loss of activity.
2. Mutton erythrocytes that have been preserved with formaline can be used in the indirect hemagglutination for more than six months or a longer period without losing their sensitivity and specificity.
3. With formalinized, sensitized mutton erythrocytes of soya protein can be ascertained in the substance of the analysis in its native form and heated up to 70°C (nuclear temperature) with concentrations from 0,1% in substance heated up to 115°C (nuclear temperature) with concentrations from 0,2% on.
4. The results of the analysis could be reproduced with the commercial meat product, submitted for examination, in the highest possible degree of certainty.
5. By using standardized, formalinized and sensitized mutton erythrocytes the expenditure of time and material for the realization of the indirect hemagglutination could be reduced to three hours.
6. By the application of the microtiter system the consumption of serum in the indirect hemagglutination can be reduced from 2,5ml to 0,0075ml.
7. With the aid of the microtiter system soya protein in concentrations from 0,1% on can be realized in native substance heated up to 115°C (nuclear temperature) and the analysed soya protein concentrations can roughly be differentiated in quantity.

F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Bailey, J.: zitiert nach Boksch, W.
Fleischwirtschaft 45 (1965), 779;
2. Beisenherz, G. , H.J. Boltze, T. Bucher, R. Czok,
K.H. Garbade, F. Meyer-Arendt und
G. Pfeleiderer:
Z. Naturforschung 8b (1953), 555;
3. Boyden, S.V.: The absorption of proteins on erythrocytes
treated with tannic acid and subsequent
hemagglutination by antiprotein in sera.
J.Exper. Med. 93 (1951), 107;
4. Boyden, S.V. and P. Grabar:
Role des lipides dans la sensibilisation
des erythrocytes par les constituants de
la tuberculine.
Ann. Inst. Pasteur 87 (1954), 257;
5. Catsimpoolas, N. und E.W.Meyer:
Immunochemical studies of Sorbean Proteins.
J. Agr. Food chemical Vol. 16 (1968), 128;
6. Cheng, T. H.: Studies on immunisation against plague.
The method of the hemagglutination test
and some observations on the antigen.
J. Immunolog. 69 (1952), 587;
7. Coons, A.H. und M. Kaplan:
Localization of antigen in tissue cells.
II. Improvement in a method for the
deduction of antigen by means of
fluorescent antibody.
J. Exper. Med. 91 (1950), 1;
8. Cox, C.D. und B. Fingerhut:
" Über die Formalinisierung sensibili-
sierter Hammelerythrozyten".
I. Lab. Clin. Med. 48 (1956), 298;
9. Czismas, L.: Konservierung sensibilisierter Hammel-
erythrozyten mittels Formalin.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 103 (1960), 157;
10. Daniel, T.M. , J.G.M. Weyand und A.B. Stavitzky:
I. Immunol. 90 (1963), 741;
11. Dean, H.R. und R.A. Webb:
The influence of optimal proportions
and antibody in the serum precipitation
reaction.
J. Path. Bact. 29 (1926), 473;
12. Degenkolb, E. und M. Hingerle:
Untersuchungen über den serologischen
Nachweis von Fremdeiweißzusätzen in
hitzedenaturierten Fleischerzeugnissen.
Arch. Lebensmittelhyg. 18 (1967), 241;

13. Degenkolb, E. und M. Hingerle:
Eine serologische Schnellmethode zum Nachweis von Fremdeiweißzusätzen in Fleischerzeugnissen.
Arch. Lebensmittelhyg. 20 (1969), 73;
14. Enoch, Ch.: Zur biologischen Differenzierung von Trockenblutplasma in hocherhitzten Fleischwaren.
Vet. med. Diss. München (1967);
15. Finger, M.: Das Freundschsche Adjuvans. Wesen und Bedeutung.
G. Fischer, Stuttgart
16. Flick, J.A.: Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 68
(1948), 448;
17. Fromm, G.: Zum immunologischen Nachweis von aufgeschlossenen Milcheiweiß in Fleischkonserven.
Arch. Hyg. 151 (1964), 702;
18. Grabar, P. und C.A. Williams:
Methode permettant l'étude conjuguée des propriétés et immunochimiques d'un mélange de protéines.
Biochem. Biophys. Acta 10 (1953), 193;
19. Günther, H.: Bestimmung von Fremdeiweiß in Fleischwaren.
Arch. Lebensmittelhyg. 20 (1969), 97 und 128;
20. Günther, H.: " Zum Nachweis von Fremdeiweiß in Fleischwaren mit Hilfe der Celluloseacetat- Folien".
Mitt. Bl. GDCh. Lebensmittelchemie Chemie 23 (1969), 303;
25 (1971), 110;
21. Hanson, L.A.: Immunological technique for the detection of milk proteins in food products.
Nordd. Vet. med. 16 (1964), 201;
22. Hayes, L.: Spezifische hemagglutination of sheep erythrocytes sensitized with bacterial polysaccharides.
Austr. J. Exp. Biol. 29 (1951), 51;
23. Haurowitz, F.: Dilatometrische Untersuchungen der Hitzedenaturierung von Eiweißlösungen.
Kolloid- Z. 71 (1935), 168;
24. Haurowitz, F.: Chemistry and biology of proteins.
Acad. Press, New York 1950, p.104 u. 280;
25. Haurowitz, F.: Biosynthese der Proteine und ihre Beeinflussung durch Antigene.
Ges. Dt. Naturf. Ärzte, (1959) S.142;
26. Hayward, B.J. und R. Augustin:
Quantitative gel-diffusion methods for assay of antigens and antibodies.
Int. Arch. Allergy 11 (1957), 192;

27. Heidelberger, M. und F.E. Kendall:
J. exp. Med. 50 (1929), 808;
62 (1935), 697;
55 (1932), 555;
28. Heidelberger, M. "Quantitative absolute methods of study of antigen- antibody reactions." Bact. Rev. 3 (1949), 49;
29. Hellmann, E. und E. Quentin:
Zum Nachweis der Verarbeitung von frischem Hühnereiklar in Brühwürsten mit Hilfe der Präzipitationsreaktion. Berl. Münchener Tierärztl. Wochenschrift 22 (1968), 444;
30. Hendrey, W.B.: Industr. Engng. Chem. Analyt. Edit. 11 (1939), 611;
31. Herrmann, Ch.: Über den Nachweis von hitzedenaturiertem Hühnereiklar in Fleischwaren mit Hilfe der indirekten Hämagglutination. Vet. med. Diss. München (1963)
32. Herrmann, Ch.: Über die zugleich quantitative Differenzierung von erhitztem Eiweiß mittels der indirekten Hämagglutination. Berl. Münchener Tierärztl. Wochenschrift 78 (1965), 370;
33. Herrmann, Ch.: Gewinnung von Antiseren für den Nachweis von Fremdeiweiß in hoch-erhitzten Fleischerzeugnissen. Arch. Lebensmittelhyg. 19 (1968), 270;
34. Herrmann, Ch.: Persönliche Mitteilung (nicht veröffentlicht)
35. Herrmann, Ch. D. Holpert, G. Pfeiffer:
Zur serologischen Erfassung von aufgeschlossenen Milcheiweiß in hoch-erhitzten Fleischerzeugnissen Arch. Lebensmittelhyg. 19 (1968), 12;
36. Herrmann, Ch. und L. Kotter
Serglogische Verfahren bei der Überwachung von Fleischerzeugnissen. Arch. Lebensmittelhyg. 19 (1968), 265;
37. Herrmann, Ch. und Ch. Merkle:
"Zur Standardisierung und Konservierung der sensibilisierten Hammelerythrozyten für die indirekte Hämagglutination zum Nachweis von Fremdeiweiß". Arch. für Lebensmittelhyg. 9 (1971), 189;
38. Ingraham, J.S.: Proc.Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 99 (1958), 1043,452;

39. Kluge - Wilm, R.: Serologischer Nachweis in hoch-
erhitzten Fleischwaren.
Vet. Med. Diss. Berlin 1967;
40. Kotter, L., Ch. Herrmann, Ch. Ring und J. Corsico:
Untersuchungen zur Steigerung der
Antikörperbildung gegen erhitztes
Eiweiß mittels Metallverbindungen.
Zbl. Vet. Med. Reihe B, 15 (1966), 613;
41. Kotter, L. , Ch. Herrmann und J. Corsico:
Zum quantitativen Nachweis von auf-
geschlossenem Milcheiweiß in hoch-
erhitzten Fleischwaren mit Hilfe der
indirekten Hämagglutination.
Z. Lebensmittel.- Unters. Forsch.
133 (1966), 15;
42. Kotter, L. , und Ch. Herrmann:
Methoden zum Nachweis von Fremdeiweiß
nach serologischen Verfahren. Sonder-
druck aus die " Fleischwirtschaft".
49. Jahrgang 1969 Heft 9 S.
1175- 1176 und 1178;
43. Krüger, H.: Versuche zum serologischen Nachweis
von Sojaprotein in Fleischwaren.
Vet. Med. Diss. Berlin 1970;
44. Krüger, H. , und D. Großklaus:
"Untersuchung zum serologischen Nach-
weis von Sojaprotein in erhitzten
Fleischwaren".
Fleischwirtschaft 50 (1970), 1529;
51 (1971), 181 u. 315;
45. Landy, M.: On hemagglutination procedures
utilizing isolated polysaccharide
and protein antigens.
Amer. J. Publ. Health 44 (1954), 1059;
46. Miermeister, A.: Nachweis und Bestimmung von Sojamehl
in Wurstwaren.
Z. Lebensmittel.-Unters. u. Forsch.
84 (1942), 392;
47. Neter, E.: Bacterial hemagglutination and hemoly-
sis.
Bact. Rev. 20 (1956), 166;
48. Duchterlony, Ö.; Diffusion in gel- methods for
immunological analysis.
I. Progr. Allergy 5 (1958), 1;
49. Duchterlony, Ö.: Diffusion in gel-methods for
immunological analysis.
II. Prog. Allergy 6 (1962), 30;

50. Oudin, J.: La diffusion d'un antigène dans une colonne de gel contenant les anticorps précipitants homologues. Etude quantitative des trois principales variables. Comptes rend. Acad. Sci. 228 (1949), 1890;
51. Pauling, L. und D. Pressmann: I. Amer. Chem. Soc. 65 (1943), 3003;
52. Pauling, L. und D. Pressmann: I. Amer. Chem. Soc. 68 (1946), 2643;
53. Ramon, G.: Sur une technique de titrage in vitro du serum antidiphtherique. Compt. rend. Soc. Biol. 86 (1922) 711;
54. Ring, Ch.: Vermehrte Bildung von Antikörpern gegen erhitztes Eiweiß mittels Metallverbindungen. Vet. Med. Diss. (1964), München
55. Scheidegger, I.: Une micro-méthode d'immuno-électrophorèse Int. Arch. Allergy 7 (1955), 103;
56. Schmidt, W.A.: Über ein Präzipitin, welches es ermöglicht, auch gekochtes (unlösliches) Eiweiß zu differenzieren. Z. Immun. Forsch. 13 (1912), 166;
57. Schmidt, H.: Fortschritte der Serologie. 2. Auflage Steinkopff, Darmstadt. (1955), 364 und 744;
58. Schmidt, H.: Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. 153 (1948/49), 142;
59. Sinell, H. J.: Verarbeitung von Hühnereiweiß in Brühwurst. Berl. Münchener Tierärztl. Wochenschrift 75 (1962), 48;
60. Sinell, H. J. und R. Kluge-Wilm: Immunelektrophoretischer Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in erhitzten Fleischerzeugnissen und Versuche zu einer quantitativen Auswertung. Zbl. Vet. Med. Reihe B 15, 802;
61. Speck, J.: Arch. exper. Vet. Med. 11 (1957), 100;
62. Stauff, J.: Kolloidchemie Verlag Springer Berlin (1960), 648;
63. Uhlenhuth, P. und W. Seiffert: Die biologische Eiweißdifferenzierung mittels der Präzipitation. In: Kolle-Kraus Uhlenhuth: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. G. Fischer, Jena, 3 (1930), 365;
64. Uhlenhuth, P.: Unterscheidung des Fleisches verschiedener Tiere mit Hilfe spezieller Sera und die praktische Anwendung der Methode in der Fleischschau. Deutsche Med. Wochenschrift 27 (1901), 780;

65. Wadsworth, C. und L.A. Hanson:
Comparative analyses of immune elektro-
phoretic precipitates employing an
modified immune elektrophoretic
technique.
Int. Arch. Allergy 17 (1960), 165;
66. Warnecke, M.D. und R.L. Saffle
Serological Identification of Animal
Proteins. 1. Mode of Injektion and
Protein Extracts for Antibody
production.
I. Food Sci. 33 (1968), 131;
67. Wide, L. und C.A. Gemzell:
Über die Formalinisierung sensibili-
sierter Hammelerythrozyten.
Acta endocrinia (Kbh.) 35 (1960), 261;
68. Weinbach, R.: Schweiz. Z. Path. Bakt. 21 (1958), 1043;
69. Wyler, O. und I.I. Siegrist:
Einfache, empfindliche Nachweismethode
für fleischfremde, tierische Eiweiß-
arten.
Mitt. Geb. Lebensmitteluntersuchungen
Hyg. 56/4 (1965), 229;
70. Wolf, A.: Veterinär Vorschriften in Bayern
Band II 68
Ergänzungslieferung 70
Verlag für Verwaltungspraxis
Franz Rehm

Herrn Prof. Dr. Dr.h.c. L.Kotter danke ich für
die freundliche Überlassung des Themas sowie
des Arbeitsplatzes herzlich.

Fräulein Dr. Herrmann bin ich für ihre wertvollen
Anregungen, ihrer stets gewährten Unterstützung
und ihrer Anteilnahme am Gelingen der Arbeit
zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

L e b e n s l a u f

Am 25.4. 1945 wurde ich als Tochter des Facharztes für Laboratoriumsdiagnostik Dr. med. habil. Ludwig Rasch und seiner Ehefrau Karla, geborene Klein, in München geboren.

Von 1951 - 56 besuchte ich die Volksschule in Berlin, ab 1956- 63 die Mädchenrealschule in Düsseldorf. Ab 1963 besuchte ich das Städtische Gymnasium Gerresheim, das über eine Aufbaustufe für Realschulabsolventen verfügt.

Am 9.2. 1966 erhielt ich das Zeugnis der Reife.

Im Sommersemester 1966 begann ich mit dem Studium der Veterinärmedizin an der Universität München und bestand dort am 7.4.1971 die Tierärztliche Prüfung.

Seit dieser Zeit bin ich als wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der Tierärztlichen Fakultät der Universität München beschäftigt.

Seit September 1971 bin ich mit dem Prokuristen Alois Wagenstaller verheiratet.

